AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN AN KANINCHENEIZELLEN NACH BEFRUCHTUNG MIT H^3-THYMIDIN MARKIERTEN SPERMIEN

Reiner Prinzen

1972

Aus der Abteilung für Andrologie und Künstliche Besamung an der
Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Universität München

Leiter: Prof. Dr. W. LEIDL

AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN AN KANINCHENEIZELLEN NACH BEFRUCHTUNG MIT H^3-THYMIDIN MARKIERTEN SPERMIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
veterinär-medizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Reiner Prinzen
aus
Krefeld

München
1972

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. J. Boessneck

Referent: Professor Dr. W. Leidl

Korreferent: Priv. Doz. Dr. R. Hebel

Tag der Promotion: 15.7.1972

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATUR	2
2.1	Allgemeine Angaben zur Autoradiographie	2
2.1.1	Zur Geschichte der Autoradiographie	2
2.1.2	Physikalische, technische und biologische Grundlagen zur Autoradiographie	2
2.1.3	Autoradiographische Methoden	5
2.1.4	Für die Autoradiographie geeignete histologische Techniken	6
2.2	Spermatogenese	8
2.2.1	Untersuchungstechniken zur Erforschung der Spermatogenese und Spermienmarkierung	9
2.3	Die Befruchtung der Eizelle	11
3.	Eigene Untersuchungen	14
3.1	Material und Methodik	14
3.1.1	Voraussetzungen zur Sperma- und Eizellmarkierung	14
3.1.2	Auswahl der Versuchstiere	15
3.1.3	Spermagewinnung, Untersuchung, Verdünnung und Anfertigung der Ausstriche für die Autoradiographie	16
3.1.4	Die Herstellung von Autoradiogrammen	16
3.1.4.1	Die Stripping-Film-Methode	16
3.1.4.2	Die Dipping-Methode	17
3.1.4.3	Vergleich der Dipping- mit der Stripping-Film-Methode	18
3.1.5	Färben	18
3.1.6	Auswertung der Autoradiogramme	18
3.2	Eizellmarkierung	19
3.2.1	Superovulation und Insemination	19
3.2.2	Eizellgewinnung	19

		Seite
3.2.3	Eröffnung des Oolemms mit Uhrmacherpinzetten	19
3.2.4	Histologische Aufarbeitung der Eizellen	20
3.2.5	Eizellauswertung	21
3.2.6	Statistik	21
3.3	Versuch zur Spermienmarkierung	22
3.4	Ergebnisse der Spermienmarkierung	23
3.5	Befruchtung von Eizellen mit markierten Spermien	26
3.5.1	Spermienmarkierung und Eizellgewinnung	26
3.6	Ergebnisse der Spermien- und Eizellmarkierung	27
3.6.1	Ergebnisse der Spermienmarkierung	27
3.6.2	Anzahl, Morphologie und Markierung der gewonnenen Eizellen	35
4.	DISKUSSION	41
5.	ZUSAMMENFASSUNG	49
6.	LITERATURVERZEICHNIS	53

1. EINLEITUNG

Während der letzten Jahre sind durch verschiedene Techniken, vor allem mit Hilfe von Radioisotopen, wesentliche Schritte im Ablauf der Spermiogenese und der Oogenese geklärt worden. So konnten die Dauer des Keimepithelzyklus, der Nebenhodenpassage der Spermien und der Desoxyribonukleinsäure-Synthese der Oogonien und Oozyten bestimmt werden.

Bisher liegen kaum Ergebnisse vor, inwieweit mit Hilfe markierter Gameten auch eine Kennzeichnung der Zygote möglich ist. Untersuchungen dieser Art können z.B. dazu benutzt werden, die Identität eines Vatertieres festzustellen, wenn mit Mischsperma von zwei Vätern inseminiert wurde, oder aber ob pathologische Spermien befruchtungsfähig sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob beim Kaninchen durch H^3 markierte Spermien bereits an der Zygote der Nachweis geführt werden kann, daß die Eizelle von diesem Spermium befruchtet wurde.

2. LITERATUR

2.1 Allgemeine Angaben zur Autoradiographie

2.1.1 Zur Geschichte der Autoradiographie

Die Autoradiographie wurde anfänglich dazu benutzt, die Verteilung von Radioaktivität in Mineralien nachzuweisen. Die ersten Tierversuche wurden von LONDON (1904), BOUCHARD et al. (1904) und KOTZAREFF (1920) durchgeführt. Diese Autoren verbrachten ganze Tierkörper oder vollständige Organe auf eine Fotoplatte, nachdem sie die Tiere von außen oder mit injizierten radioaktiven Isotopen (z.B. Radium) behandelt hatten. LACASSAGNE und LATTES (1924) haben versucht, Polonium in Gewebeschnitten nachzuweisen. Sie betteten ein Gewebestück in Paraffin ein und legten eine plane Schnittfläche des Paraffinblockes auf die Fotoplatte, Das Autoradiogramm wurde dann mit dem histologischen Schnitt verglichen.

Die ersten Autoradiogramme mit induzierter Radioaktivität wurden von GROVEN et al. (1938) angefertigt. Die induzierte Radioaktivität rührt von künstlich im Reaktor hergestellten Isotopen her.
Die Technik der Autoradiographie, wie sie heute angewendet wird, geht auf LEBLOND (1943) zurück. Er hat als Erster ein histologisches Präparat zwischen eine Glasplatte und einen Film verbracht. Durch diese Idee angeleitet, entwickelte BELANGER (1950) eine erfolgreiche Methode, mit der man gleichzeitig den gefärbten histologischen Schnitt und das Autoradiogramm unter dem Mikroskop beurteilen kann.

2.1.2 Physikalische, technische und biologische Grundlagen zur Autoradiographie

Beim radioaktiven Zerfall wird vom Atomkern Energie in Form von Strahlung abgegeben, z.B. durch Emission von Alpha- und Beta-Teilchen oder Gamma-Quanten (FISCHER und WERNER, 1971).
Alpha-Teilchen kommen nur bei natürlichen radioaktiven Elementen vor. Es handelt sich um Heliumatomkerne, die aus 2 Neutronen und 2 Positronen be-

stehen.

Beta-Strahler ermittieren Elektronen oder Positronen, wobei entweder ein Neutron in ein Proton, oder ein Proton in ein Neutron verwandelt wird. Positronenstrahler sind selten und haben für die Autoradiographie wenig Bedeutung.

Bei der Vereinigung von Elektronen und Positronen entstehen Gamma-Quanten, und zwar so lange, wie beim radioaktiven Zerfall noch kein stabiler Folgekern entstanden ist, der Kern sich also noch in einem "angeregten" Zustand befindet. Gamma-Quanten sind Photonen aus dem Bereich der Röntgenstrahlen im elektromagnetischem Spektrum. Sie sind für die Autoradiographie kaum nutzbar und können für den Experimentator gefährlicher sein als Alpha- und Beta-Strahler.

Eine zweite Definition für Strahler geht von ihrer Energie aus. Langstrahler oder Langwellenstrahler haben im Gegensatz zu Mittel- oder Kurzwellenstrahlern eine geringere Energie.Sie haben deswegen ein niedrigeres Durchdringungsvermögen als Mittel- oder Kurzstrahler. Kurzwellige Strahler werden auch als hart und langwellige Strahler als weich bezeichnet (HÖFLING, 1959).

Bei der Autoradiographie finden vor allem langwellige Alpha- und Beta-Strahler Verwendung. Sie sind in den Präparaten unter der Fotoemulsion inkorporiert und schwärzen an der Stelle, an der sie sich befinden die Silberkörner der Emulsion (SCHWEITZER und WHITNEY, 1949; BOYD, 1955; SCHMEISER, 1957; BRODA, 1958; HANLE, 1964; FISCHER und WERNER, 1971).

Die Reaktion der Emulsion auf Strahlen hängt sehr von der Art der Strahlen ab, die sie durchdringen. Alpha-Teilchen, die eine große Masse haben und die sich relativ langsam bewegen, geben ihre Energie an Atome ab, die in ihrer Nähe oder auf ihrer Bahn liegen, aber sie tendieren nicht dazu, von einem nahezu geraden Weg abzuweichen. Die Spur eines Beta-Teilchens ist viel komplizierter, da es nur eine kleine Masse aufweist und leicht durch Atome von seinem Weg abgeleitet wird. Röntgen- oder Gamma-Strahlen haben eine verschwindend kleine Masse und werden selten in Nuclear-Emulsionen, das sind Emulsionen zu autoradiographischen Untersuchungen, vorgefunden,

es sei denn, sie regen Sekundärelektronen an.

Von entscheidender Bedeutung für das Ergebnis der Autoradiographie ist die Qualität der Fotoemulsion. Alle monochromen Filmemulsionen bestehen aus einer Mischung von Gelatine und kristallinen Silbersalzen, vor allen Dingen Bromiden. Normale Fotoemulsionen enthalten 30% Silbersalze mit einer relativ groben Korngröße. Nuclear-Emulsionen bestehen dagegen zu 90-95% aus Silbersalzen in einer feinen Korngröße (0,2 - 0,3 Mikron). Die Nuclearemulsion erreicht ihre Empfindlichkeit durch den hohen Gehalt an Silbersalzen. Durch die geringe Korngröße ist ihr Auflösungsvermögen ausgezeichnet (Kodak Data Booklet SC-10, FISCHER und WERNER, 1971).
Um gute Autoradiogramme zu erreichen, sind, neben der Wahl des Isotops und fotografischen Faktoren, auch physiologische, biochemische und metabolische Kriterien zu berücksichtigen. So verwendet man z.B. H^3-Thymidin für Studien der Desoxyribonukleinsäure (DNS) und/oder Zellvermehrung, Eisen (Fe^{55}) und Chrom (Cr^{51}) für Studien an Erythrozyten, Strontium (Sr^{85}) und Calzium (Ca^{45}) für Beobachtungen an Knochen usw. Generell gilt für die Autoradiographie, daß ein stark ionisierendes Isotop ausgewählt werden sollte, um das Gewebe zu durchdringen und in der Emulsion eine möglichst lange Spur zu hinterlassen. Isotope mit geringer Energie, wie Tritium und C^{14}, dringen nicht weit durch Gewebe und Emulsion. Sie gehören zu den schwächsten Beta-Strahlern. Dieser Nachteil wird durch andere Eigenschaften aufgewogen. Sie weisen ein sehr gutes Auflösungsvermögen auf und besitzen eine relativ lange Halbwertszeit (FISCHER und WERNER, 1971).

Die Handhabung des Isotops und die Zeitdauer, nach der ein behandeltes Tier getötet oder nach der eine Biopsie vorgenommen werden soll, hängen von der Art des Versuchs ab. Generell gilt, daß der Zeitraum zwischen der Verabreichung des Isotops und der Gewinnung des Gewebeschnittes für die Autoradiographie im Verhältnis zu der Halbwertszeit des Isotops relativ kurz sein sollte. Die Anfertigung der histologischen Präpate soll möglichst rasch erfolgen (JOFTES und WARREN, 1955; FISCHER und WERNER, 1971).

2.1.3 Autoradiographische Methoden

Zur Herstellung von Autoradiogrammen sind im wesentlichen zwei Methoden gebräuchlich, nämlich die Dipping- und die Stripping-Film-Methode.

Die Dipping-Methode

Die histologischen Präparate werden bei dieser Methode in eine auf 40°C erwärmte Fotoemulsion getaucht, die mit Aqua dest. auf eine brauchbare Konsistenz verdünnt worden ist. Nach einer Trocknungszeit von mehreren Stunden werden die Autoradiogramme in lichtundurchlässigen Kästen im Kühlschrank bei 5°C belichtet (YAGODA, 1949; LAUDA, 1954; JOFTES u. WARREN, 1955; ROGERS, 1967).

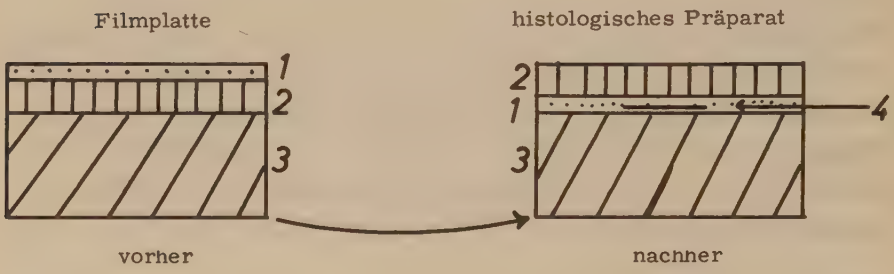
Die Stripping-Film-Methode

Hier ist die Fotoemulsion auf eine Glasplatte oder auf einen stärkeren Filmstreifen aufgetragen. Eine zusätzliche Gelatineschicht schützt und festigt die Emulsion.

Zunächst wird die Filmplatte in eine Saccharoselösung gelegt. Der Stripping-Film wird nach einer Quellungsperiode von der Trägerplatte gelöst und auf den mit einem histologischen Schnitt versehenen Objektträger aufgezogen und zwar mit der Fotoemulsion zum Objektträger, so daß ein inniger Kontakt zwischen Objekt und Fotoemulsion entsteht (BELANGER und LEBLOND, 1946; BELANGER, 1950; FITZGERALD et al., 1953; BOYD, 1955; PELC, 1956; SCHWIEGK, 1961; WANG und WILLIS, 1965).

Die Dipping-Methode ist technisch leichter durchführbar als die Stripping-Film-Methode. Sie weist jedoch einen höheren Nulleffekt auf, d.h. es werden materialbedingte Schwärzungen sichtbar, die nicht durch vom Objekt emittierte Strahlen verursacht sind.

Abb. I Vergleichende Darstellung einer Stripping-Film-Platte und eines Autoradiogrammes
(1 = Filmemulsion; 2 = Gelatineschicht; 3 = Glasplatte
4 = histolog. Schnitt)



2.1.4 Für die Autoradiographie geeignete histologische Techniken

Im allgemeinen kann man gebräuchliche histologische Methoden anwenden, mit der Einschränkung, daß die verwendeten Reagentien die durch Isotopen markierten Verbindungen nicht aus dem Gewebe herauslösen. Alles, was zu einer Lösung der radioaktiven Substanzen beiträgt, muß vermieden werden. Färbungen, die vor der Autoradiographie durchgeführt werden können, sind u.a. Feulgen-Fastgreen, Hämatoxylin-Phloxin und Aldehydfuchsin-PAS. Bei Färbungen nach der Autoradiographie werden u.a. Cölestinblau-Hämalaun, Metanilgelb-Eisenhämatoxylin, Methylgrün-Pyronin, Indigokarmin-Pikrinsäure und Toluidinblau herangezogen (v. DEIMLING, WITSCH und ROSSNER, 1968; THURSTON und JOFTES, 1963). Das Färben der Gewebeschnitte muß unter Berücksichtigung der Autoradiographie erfolgen; wenn das Präparat gefärbt worden ist, bevor die Emulsion aufgetragen wurde und keine Schutzschicht vorhanden war, so kann der fotografische Vorgang u.U. den Schnitt weitgehend entfärben. Falls Mittel- oder Langstrahler benutzt werden, ist es möglich, eine Schutzschicht aus Celloidin oder Nylon unter der Emulsion zu verwenden. Die Schutzschicht hält zusätzlich reduzierende Substanzen, die einen autoradiographischen Effekt vortäuschen können, zurück (BOYD, 1955;

GETOFF, 1961). Tritium und C^{14} sind derart weiche Strahler, daß sogar eine Schutzschicht von einem Mikron Dicke die Strahlenmenge, die die Emulsion erreicht, stark reduziert. Deswegen können bei diesen Isotopen keine Schutzschichten verwendet werden. Bei H^3 und C^{14} wird daher empfohlen, zuerst das Autoradiogramm anzufertigen und dann zu färben (JOFTES und WARREN, 1955; GETOFF, 1961).

2.2 Spermatogenese

Die Spermatogenese läuft bei allen untersuchten Säugern streng gesetzmäßig ab. Die einzelnen Vorstufen der Spermien, nämlich Spermatogonien, Spermatozyten und Spermatiden, liegen in wohlgeordneten Verbänden im germinativen Epithel vor. Die Zellteilungsvorgänge während der Spermatogenese sind synchronisiert, d.h., daß in den Hodentubuli die Zellgenerationen nicht willkürlich anzutreffen sind.

Dieser Ablauf der Spermatogenese wurde bereits 1878 von v. EBNER und in neuerer Zeit von verschiedenen Autoren für die einzelnen Spezies in genau definierte Phasen unterteilt und zwar von ROOSENRUNGE (1951) für die Ratte, ORTAVANT (1954, 1959) für Schaf und Rind, CLERMONT und LEBBLOND (1955, 1959) für Mensch, Affe, Schaf und andere, OAKBERG (1956) für die Maus, von KRAMER (1960) für das Rind, AMANN (1962) für das Rind, CLERMONT (1963) für den Menschen, TIBA (1965) für das Rind, HILSCHER und MAURER (1966, 1969) für die Ratte und SWIERSTRA (1968b) für das Schwein.

Die Serie von Veränderungen zwischen zwei aufeinanderfolgenden Erscheinungen derselben Zellassoziation an einer bestimmten Stelle des Hodentubulus (LEBLOND und CLERMONT, 1952) wird als Samenepithelzyklus bezeichnet. SWIERSTRA und FOOTE (1965) teilen beim Kaninchen den Samenepithelzyklus, der bei dieser Spezies 10,9 Tage in Anspruch nimmt, in 8 Phasen ein.

Die Lebensdauer der einzelnen Zellgenerationen ist unterschiedlich. Sie beträgt bei den A-Spermatogonien 3,4 Tage, bei den Intermediärspermatogonien 1. und 2. Ordnung 0,6 bzw. 2,8 Tage, bei den B-Spermatogonien 1,1 Tage, bei den primären Spermatozyten 16,5 Tage, bei den sekundären Spermatozyten 0,9 Tage, bei den Spermatiden 10,0 Tage und bei den Spermatozoen 5,6 Tage. Die Spermatogenese dauert von den ersten spermatogonalen Teilungen bis zur Abstoßung der reifen Spermien in die Tubuli etwa 4 Zyklen, das sind 4 mal 10,9 Tage also 43,6 Tage. Wenn man jedoch als Beginn der Spermatogenese die Formation der Stammzellen ansieht, deren Lebensdauer ca. einen Zyklus beträgt, dann ergeben sich für die Spermatogenese 4,75 Zyklen oder 51,8 Tage (SWIERSTRA und FOOTE, 1965).

2.2.1 Untersuchungstechniken zur Erforschung der Spermatogenese und Spermienmarkierung

Um die Dauer des Samenepithelzyklus und die verschiedenen Zellteilungsvorgänge festlegen zu können, wurden eine Anzahl von Methoden entwickelt: Colchicin-Injektionen (ROOSEN-RUNGE, 1951), Röntgenbestrahlung (OAKBERG, 1956), Steigerung der Hodentemperatur (ASDELL und SALISBURY, 1941) und vor allem Injektionen mit Isotopen (ORTAVANT, 1956; SIRLIN und EDWARDS, 1958; CLERMONT et al., 1959; KOEFOED-JOHNSON, 1959; HELLER und CLERMONT, 1963; YASSEN und FOOTE, 1963; AMANN et al., 1965; HUCKINS, 1965; ORGEBIN-CRIST, 1965; SWIERSTRA und FOOTE, 1965; HILSCHER et al. 1966; HUNT und FOOTE, 1967; TAKEDA et al., 1968). Die verschiedenen Methoden bis auf die zuletzt genannte verursachen Schädigungen des Keimepithelwachstums. Isotope jedoch können in den einzelnen Zellgenerationen nachgewiesen werden. Man verfährt nun so, daß mittels der Faktoren, die durch Einsetzen der Noxe und dem Tötungszeitpunkt bekannt sind, die Generationszeit ermittelt wird.

Die meisten Autoren geben in jüngster Zeit der zuletzt angeführten Technik den Vorzug. Das geeignetste Isotop, um Zellen des Germinativums zu markieren, ist das Tritium. FOOTE (1959) schlägt speziell die Verbindung Tritium-Thymidin zur Spermienmarkierung vor, da nur diese Verbindung allein im Kern der Spermien verankert bleibt, während andere Isotope auch in den übrigen Gewebeformationen des Hodens und im Samenplasma inkorporiert werden. Die Verabreichung erfolgt an die DNS-Base Thymidin gebunden, in wässriger Lösung entweder intraabdominal oder intravenös. Das H^3 markierte Thymidin kann in den Zellgenerationen, in denen der Einbau erfolgt, durch die Autoradiographie nachgewiesen werden.

Auch NEBEL et al. (1960) weisen bei der Ratte nach, daß H^3-Thymidin nur von Spermatogonien und Spermatozyten aufgenommen wird und nicht von anderen sich teilenden Zellen des Hodens. Sie erwähnen weiterhin, daß H^3-Thymidin keine Schädigung der Spermatogenese bedingt.

Auch SWIERSTRA und FOOTE (1965) stellen fest, daß primäre Spermatozyten im Präleptotänstadium die letzten Zellen sind, die noch mit Tritium mar-

kiert werden. Es handelt sich dabei um die letzte Zellgeneration, bei der DNS in der Spermatogenese synthetisiert wird. Daraus läßt sich ablesen, daß in den folgenden Teilungs- und Reifungsprozessen keine DNS mehr in der Spermiohistogenese synthetisiert wird.
Andere Autoren beschreiben Markierungen mit Methionin-S^{35} (EDWARDS und SIRLIN, 1958), Adenin-8-C^{14} (KOEFOED-JOHNSON und FOOTE, 1959) und P^{32} (KOEFOED-JOHNSON, 1959). Es wird jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, daß mit diesen Stoffen auch andere Gewebe im Hoden und das Samenplasma radioaktiv markiert werden.

Neben den bisher besprochenen Untersuchungen der Spermatogenese mit Hilfe histologischer Präparate des Hodens können auch Samenausstriche autoradiographisch ausgewertet werden. Sie dienen entweder zur Bestimmung des genauen Zeitpunktes, zu welchem markierte Spermien im Ejakulat erscheinen oder zur Festlegung des Grades und des Prozentsatzes der Markierungen zu ermitteln. Beim Kaninchen verlassen 31 Tage post injectionem die als primäre Spermatozyten im Präleptotän markierten Spermien die Hoden (AMANN et al., 1965). Wenn man weitere 8 - 10 Tage für die Nebenhodenpassage ansetzt (KOEFOED-JOHNSON und FOOTE, 1959; YASSEN und FOOTE, 1963; AMANN et al., 1965), so sind beim Kaninchen 39 - 41 Tage p. i. die ersten markierten Spermien im Ejakulat anzutreffen.

2.3 Die Befruchtung der Eizelle

Die Spermien, die das Ei befruchten sollen, müssen einen beträchtlichen Weg zurücklegen, bis sie die Eizelle erreichen. Um die Samenfäden von der Scheide bis zum Ovidukt, dem Ort der Befruchtung, gelangen zu lassen, bedarf es verschiedener Mechanismen und biochemischer Vorgänge, die hier vor allem in Bezug auf das Kaninchen beschrieben werden sollen.
Die Spermien kommen durch natürliche Belegung oder durch künstliche Besamung in den Uterus. Durch einen neurohormonalen Reflex wird eine Uterusperistaltik ausgelöst, die die Spermien passiv bis in die Nähe des Eies befördert. Dieser Spermientransport ist bei den meisten Spezies in kurzer Zeit abgeschlossen, dauert beim Kaninchen jedoch ca. 3 Stunden (ADAMS, 1969). Er erfaßt nicht nur morphologisch intakte Spermien, sondern auch tote und pathologische Formen (VANDEMARK und MOELLER, 1951).
Auf die Bedeutung der Eigenbewegung der Spermien hat KOLLER (1966) hingewiesen. Es wurde festgestellt, daß sie durch die Uterussekretion angeregt wurde. Unter Umständen spielt auch die Stärke und Richtung der Sekretion eine Rolle, da YAMANE et al. (1932) fanden, daß Pferdespermien sich schneller bewegten, wenn sie in ein strömendes Medium verbracht wurden.
Bis in die unmittelbare Nähe der Eizelle gelangen nur einige Tausend Spermien. Die übrigen werden durch rhythmische Kontraktionen des Oviduкts zusammen mit dem Samenplasma abgepreßt (MANN, 1964).
Da zur Befruchtung einer Eizelle immer nur ein Spermium benötigt wird, stellt sich die Frage, warum bei jedem Begattungsakt Millionen von Spermien in das weibliche Genitale gelangen. Hauptursache dürfte sein, daß die Samenfäden erst im weiblichen Genitale ihr volles Befruchtungsvermögen erhalten und die große Zahl an Spermien Fehlergebnisse verhindern soll.
Die Spermien halten sich vor der Befruchtung mehrere Stunden im weiblichen Genitale auf. Während dieser Zeit vollziehen sich an den Samenfäden verschiedene biochemische Prozesse, an deren Ende die Befruchtung steht und die in ihrer Gesamtheit als Kapazitation bezeichnet werden. Die Spermien erfahren dabei eine Reifung, die sie befähigt, in das Ei einzudringen. Nicht kapazierte Spermien sind nicht in der Lage, eine Eizelle zu befruchten. Es

ist bis heute nicht endgültig geklärt, welche Vorgänge bei der Kapazitation ablaufen (ADAMS, 1969). Die bisherigen Untersuchungen lassen vermuten, daß die Kapazitation eine Änderung der Kohlehydrat enthaltenden Makromoleküle verursacht, die die Spermien einhüllen (WIRTON, 1965).
Bei Nagern und vor allem bei wirbellosen Tieren ist die Kapazitation durch die Akrosomenreaktion gekennzeichnet. Man versteht darunter eine Auflösung der Kopfkappe. Beim Kaninchen kann dann das Spermium in die die Eizelle umgebende Mukoproteidschicht eindringen (DAN, 1956; COWIN et al., 1957; FRANZEN, 1958). Frisch ejakulierte Spermien und solche aus dem Nebenhoden sind dazu nicht in der Lage (AUSTIN, 1961; HUNTER und DZIUK, 1968). Unter normalen Umständen befinden sich die Spermien zum Zeitpunkt der Ovulation in der Ampulle des Eileiters (BEDFORD, 1970). Um die Eizelle zu erreichen, müssen sie nun einen dicken Wall durchdringen, der sich aus Cumulus oophorus, Corona radiata und Zona pellucida zusammensetzt. Dies gelingt aber nur den kapazitierten, d.h. Spermien, die sich schon seit einigen Stunden im weiblichen Genitale aufhalten. Beim Kaninchen sind dazu ca. 6 Stunden notwendig.

Auf die Bedeutung der Hyaluronidase (MANN, 1964) beim Befruchtungsvorgang, die sich reichlich in Hoden- und Samenflüssigkeit befindet, wird bei BIERWAG und DÖRING (1958) hingewiesen. Über ihre Wirkungsweise haben sich dabei 4 Hypothesen herauskristallisiert:

1. Die Hyaluronidase lockert die Kittsubstanzen zwischen den Zellen der Corona radiata auf und ermöglicht so den Spermien, zu der Eizelle zu gelangen.
2. Die Hyaluronidase baut Mukopolysaccharide in Monosaccharide ab, die als erste Nahrung der befruchteten Eizelle gelten.
3. Die Hyaluronidase soll die Nidation der Eizelle begünstigen.
4. Die Lebensdauer der Spermien wird verlängert.

Eindeutig belegt ist jedoch nur, daß ein Zuviel wie ein Zuwenig an Hyaluronidase die Befruchtungsfähigkeit des Spermas ungünstig beeinflussen (BIERWAG und DÖRING, 1958):

Bei der Befruchtung stoßen beim Kaninchen mehrere Spermien durch alle die

Eizelle umgebenden Schichten und bleiben im perivitellinen Raum liegen. In das Zellplasma dringt jedoch meist nur ein Spermium ein, so daß jeweils die Kernsubstanz von einem Spermium und einer Eizelle verschmelzen. Gelegentlich wird aber auch das Eindringen von zwei Spermien beobachtet. Der hieraus resultierende triploide Chromosomensatz führt zu einem frühzeitigen Absterben der Embryonen (METZ und MONROY, 1969)

Auffallend ist, daß, im Gegensatz zu anderen Spezies, beim Kaninchen immer ein hoher Anteil von ovulierten Eizellen befruchtet wird. Der hohe Befruchtungsgrad ist nach den Untersuchungen von DICKMANN (1961) im wesentlichen auf die spezielle Funktion des Eileiters des Kaninchens zurückzuführen. Er konnte einen auf- und einen absteigenden Flüssigkeitsstrom feststellen, der Spermien und Eizelle aufeinander zubewegt.

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methodik

3.1.1 Voraussetzungen zur Sperma- und Eizellmarkierung

Bei der in dieser Arbeit geforderten Aufgabenstellung kommt es darauf an, die Markierungen der Spermien-DNS auf die Eizelle zu übertragen. Dazu sind folgende Voraussetzungen zu erfüllen: Es müssen einmal nach Möglichkeit alle Spermien des Ejakulates, mit dem das weibliche Tier besamt werden soll, markiert sein. Die Markierung soll so hoch sein, daß sie nicht während der Teilungsvorgänge der Eizelle verloren geht. Weiterhin soll die Markierung nur im Kernmaterial anzutreffen sein, um die definitive Aussage machen zu können, daß sie auch tatsächlich von dem Spermium stammt, welches die Eizelle befruchtet hat. Deshalb mußte zunächst bestimmt werden, wann im Ejakulat die meisten markierten Spermien mit der höchsten Silberkornzahl auf den Autoradiogrammen zu finden sind.
Beim Kaninchen werden die ersten markierten Spermien nach einmaliger Injektion von H^3-Thymidin am 39. bis 42. Tag post injectionem ausgeschieden. Der Prozentsatz der markierten Spermien ist in den ersten Tagen gering, auffallend jedoch ist die große Anzahl von Markierungen pro Spermium. Im folgenden steigt die Zahl der markierten Spermien an, um über einen Zeitraum von 10 Tagen ein Maximum von 55% aufrecht zu erhalten. Die Intensität ist jedoch schon wieder geringer als in den ersten Tagen. Markierte Spermien können nach einmaliger Injektion von H^3-Thymidin bis zu 125 Tage nachgewiesen werden (KOEFOED-JOHNSON, 1959).
Da bekanntlich als letzte Zellgeneration aus der Spermatogenese die primären Spermatozyten im Präleptotän markiert werden, läßt sich erklären, warum in den ersten radioaktiven Ejakulaten nur wenige, aber hoch markierte Spermien auftauchen. Diese Zellen teilen sich im Laufe der Spermatogenese nur noch 2 mal, so daß ein Viertel des ursprünglich aufgenommenen H^3-Thymidins in den aus diesen Zellen resultierenden Spermien vorliegt. Alle in früheren Stadien markierten Zellen teilen sich öfter, und die daraus entstehenden Spermien enthalten entsprechend weniger H^3-Thymidin. Für die be-

absichtigte Markierung der Eizellen durch das befruchtende Spermium wurde angestrebt, die hochmarkierten Spermien zu nutzen.
Um die Zahl der markierten Spermien mit einer großen Silberkornzahl zu steigern, wurde deshalb bei diesen Versuchen einem Kaninchen im Abstand von 12 Stunden 4 mal eine Dosis H^3-Thymidin i.v. injiziert. Für die Wahl des Intervalls zwischen den Injektionen waren die Beobachtungen von ORGEBIN-CRIST (1965) ausschlaggebend. Sie stellte fest, daß im Nebenhoden nach einmaliger Injektion mit H^3-Thymidin markierte Spermien in sukzessiven Wellen durch den Ductus epididymidis transportiert werden. Die Wellen folgen einander im Abstand von 2 Tagen. Die ersten markierten Spermien stammen aus den im Präleptotän markierten Spermatozyten und die zweite Welle aus den B-Spermatogonien. Die Ausscheidung im Ejakulat erfolgt nicht streng getrennt nach den Wellen, da die Spermien im Nebenhoden gemischt werden. Die an der Peripherie befindlichen Samenzellen werden schneller transportiert, und weiterhin tritt im Nebenhodenschwanz eine Vermischung mit dort gelagerten Spermien ein (ORGEBIN-CRIST, 1965).
Durch die Verabreichung von 4 Tritium-Thymidin-Gaben im Abstand von jeweils 12 Stunden soll erreicht werden, daß trotz des Mischungsprozesses im Nebenhoden in einem Ejakulat ein großer Prozentsatz der Spermien hoch markiert ist.

3.1.2 Auswahl der Versuchstiere

Die 3 verwendeten Kaninchenböcke (Holländerkaninchen) wurden aus einer größeren Zahl ausgewählt. Um für die Versuche geeignet zu sein, mußten sie ein Kaninchenphantom bespringen und die künstliche Scheide annehmen. Zum anderen mußte gewährleistet sein, daß sie über einen längeren Zeitraum täglich einmal ejakulierten. Außerdem war eine hervorragende Spermienbeschaffenheit hinsichtlich der Dichte, der Morphologie und der Motilität als Voraussetzung für ein gutes Befruchtungsvermögen erforderlich. Das Befruchtungsvermögen wurde darüberhinaus noch vor Versuchsbeginn durch Belegen von mehreren Häsinnen überprüft.
Die weiblichen Kaninchen für die Insemination mit den markierten Spermien

entstammten keiner bestimmten Rasse.

3.1.3 Spermagewinnung, Untersuchung, Verdünnung und Anfertigung der Ausstriche für die Autoradiographie

Das Sperma wurde mit der künstlichen Scheide am Phantom gewonnen; anschließend wurden Volumen, Motilität, Dichte und Morphologie mit den üblichen Methoden untersucht (SCHÄTZ, 1963). Für die Autoradiographie wurden Ausstriche im hängenden Tropfen angefertigt und luftgetrocknet.
Um eine möglichst große Zahl von Tieren an einem Tag besamen zu können, wurden die Ejakulate mit Tris-Verdünner nach STEINBACH und FOOTE (1964) verdünnt. Dieser Verdünner besteht aus Pufferlösung: 6,056 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; 3,4 g Citronensäure und 2,5 g Fruktose. Die Substanzen werden in 168 ml Aqua dest. aufgekocht. Nach dem Abkühlen wird 88,0 ml der Pufferlösung mit 12,0 ml Aqua dest. und 25,0 ml Eidotter versetzt. Keimhemmende Zusätze konnten entfallen, weil der Samen sofort nach der Verdünnung verwendet wurde. Es mußte eine Mindestzahl von 1 Million motiler Spermien pro Inseminationsdosis (0,4 ml) gewährleistet sein.

3.1.4 Die Herstellung von Autoradiogrammen

3.1.4.1 Die Stripping-Film-Methode

Die luftgetrockneten Ausstriche wurden in Chromalaungelatine (0,5 g Gelatine ad 100 ml Aqua bidest. im Wasserbad mit Rücklaufkühler auf 37° erhitzen und 0,05 g Chromalaun hinzufügen) getaucht. Danach wurde die Rückseite der Präparate sauber abgewischt. Die Filmplatten wurden in der Dunkelkammer auf einer Schablone geschnitten und in eine Saccharoselösung (Saccharose reinst 200 g, Kaliumbromid 0,1 g ad 1000, Gebrauchslösung 1 : 10 mit Aqua dest. verdünnen) gelegt. Die passend zugeschnittenen Filmstreifen wurden von der Trägerplatte gelöst und mit der Oberseite zum Ausstrich auf den Objektträger so aufgezogen, daß sie auf die Rückseite umschlugen, um besser zu haften.
Die so behandelten Ausstriche wurden eine Nacht lang getrocknet und in licht-

dichte Kästen zur Belichtung einsortiert. Diese Kästen wurden mit einem schwarzen Klebeband verschlossen und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.
Der Belichtungsvorgang oder die Expositionszeit wurde vom trockenen Zustand der Präparate an berechnet.
Nach 21 Tagen Expositionszeit wurden die Ausstriche in Kodak-Entwickler D-19 (Handhabung nach Vorschrift der Firma) 6 Minuten lang bei 20°C entwickelt, in Leitungswasser abgespült und 10 Minuten lang in Acidofix (Kodak) fixiert.
Die Arbeiten in der Dunkelkammer wurden mit Rotlicht (Kodak-Safelight Filter Nr. 1) vorgenommen.

Nach dem Fixieren wurden die Präparate eine halbe Stunde lang in fließendem Wasser gewässert. Noch in nassem Zustand wurde der Stripping-Film mit einem Rasiermesser von der Rückseite des Objektträgers entfernt, weil die umgeschlagenen Filmstreifen bei der Färbung der Präparate mit gefärbt würden und dadurch die Auswertung der Autoradiogramme u.U. erschweren könnten.

3.1.4.2 Die Dipping-Methode

Die Fotoemulsion(Kodak NTB 2) wurde in einem Wasserbad auf + 40°C erwärmt, da sie in einem Gelzustand geliefert wird und bei Aufbewahrungstemperatur (+4°C) nicht verwendet werden kann. Die erwärmte Emulsion wurde mit Aqua dest. (ebenfalls +40°C) im Verhältnis 1 : 1 gemischt. Das Mischen muß vorsichtig erfolgen, damit keine Luftblasen in der Flüssigkeit entstehen. In die so vorbereitete Emulsion wurden die Ausstriche kurz getaucht. Die Rückseite der Objektträger wurde gereinigt und es wiederholten sich Trocknen, Einsortieren und Belichten entsprechend der Stripping-Film-Methode. Die Arbeiten wurden mit Kodak Safelight Filter Nr. 2 vorgenommen.

3.1.4.3 Vergleich der Dipping- mit der Stripping-Film-Methode

Um einen Vergleich im Hinblick auf die Brauchbarkeit der Technik zu erhalten, wurden die Autoradiogramme teilweise mit der Stripping-Film-Methode und teilweise mit der Dipping-Technik hergestellt. Das Material stammte in beiden Fällen von Kodak in NTB-Qualität. Die Autoradiogramme wurden nach 21 Tagen Expositionszeit entwickelt und fixiert.

3.1.5 Färben

Die Präparate wurden sofort nach dem Fixieren noch naß oder in trockenem Zustand in frischem Haemalaun nach MAYER (Merck) ca. 10 - 15 Minuten gefärbt und in fließendem Leitungswasser 10 - 15 Minuten gewässert. Nach dem Trocknen im Brutschrank bei 37°C oder bei Zimmertemperatur wurden die Deckgläschen auf die Präparate mit KAISERS Gelatine (Merck) aufgebracht.

3.1.6 Auswertung der Autoradiogramme

Im Versuch zur Ermittlung der Spermienmarkierung wurden 1000 und im Versuch zur Markierung der Zygoten 500 Spermien pro Tag und Ausstrich ausgewertet, und zwar wurde die Zahl der geschwärzten Silberkörner pro Spermium festgehalten. Dabei wurden die Spermien willkürlich der Reihe nach erfaßt soweit sie technisch verwertbar waren. Der Nulleffekt wurde mit dem Integrationsokular bestimmt. Unter dem Nulleffekt versteht man auf dem Film geschwärzte Silberkörnchen, die wie Markierungen aussehen. Sie rühren in Wirklichkeit jedoch von Sekundärelektronen her, die bei der Handhabung und der Lagerung des Filmmaterials entstanden sind.
Der Nulleffekt wurde so bestimmt, daß auf den Leerstellen des Präparates die Zahl der Silberkörner pro Flächeneinheit, die einem Spermienkopf entspricht, berechnet wurde. Pro Ausstrich wurden in 5 Gesichtsfeldern die Silberkornzahl ermittelt und auf die Fläche eines Spermienkopfes umgerechnet.

3.2 Eizellmarkierung

3.2.1 Superovulation und Insemination

Die Superovulation wurde dadurch ausgelöst, daß weiblichen Kaninchen über 3 Tage 2 mal täglich morgens und abends Follikelstimulierendes-Hormon (0,5 mg FSH/Injektion, Armour-Baldwin Laboratories, U.S.A.) s.c. und am 4. Tag morgens Luteinisierungs-Hormon (0,25 mg LH/Injektion, Armour-Baldwin Laboratories, U.S.A.) i.v. injiziert wurde (KENNELLY und FOOTE, 1966). Sofort nach LH-Applikation wurde die Insemination mit 0,4 ml verdünntem Samen durchgeführt.

3.2.2 Eizellgewinnung

Die Tiere wurden 28 bis 36 Stunden nach der Insemination getötet. Mit einem Medianschnitt wurde die Bauchhöhle eröffnet und jeweils ein Uterushorn samt Eileiter und Ovar extraabdominal verlagert. Ein ca. 15 cm langer Polyaethylenschlauch wurde in den Fimbrientrichter des Eileiters eingeführt und mit einer Plastikklammer fixiert. Von caudal wurde eine abgeschliffene Injektionskanüle in den Uterus eingestochen und durch die Uterus-Eileiterverbindung bis zum Isthmus vorgeschoben (MAURER, 1969). Mit einer mit 3 ml Blutplasma (Rind) gefüllten 5-ml-Spritze wurden die Eizellen über den Schlauch in ein Schälchen gespült. Anschließend wurde das Plasma mit 1 ml Luft aus dem Eileiter völlig ausgedrückt. Das verwendete Rinderblutplasma wurde nach Zentrifugation aus Zitratblut gewonnen (KENNELLY und FOOTE, 1966).

3.2.3 Eröffnung des Oolemms mit Uhrmacherpinzetten

Das Öffnen der Eizellen sollte ohne aufwendige histologische Verfahren ermöglichen, das Zellinnere bzw. die sich im Oolemm befindlichen geteilten Zellen auf einen Objektträger zu bringen, um sofort Autoradiogramme anfertigen zu können. Dabei wurde davon ausgegangen, daß das Zellplasma mit dem Zellkern so weit eintrocknet, daß sich die Markierungen darstellen lassen.

Die Eizellen wurden mit einer silikonisierten Pasteurpipette einzeln aus dem Auffanggefäß herausgenommen und auf einen säuregereinigten Objektträger gesetzt. Der anhaftende Plasmatropfen wurde so weit wie möglich abgesaugt.
Um das Oolemm mit Uhrmacherpinzetten aufreißen zu können, mußten die Eizellen vorher mit Pronase (Merck) behandelt werden (ONUMA et al., 1968). Die Pronase ist ein Streptomyces griseus-Ferment, das in der Lage ist, die das Oleum umgebende Mucoproteidschicht porös zu machen oder ganz aufzulösen. Die sich auf dem Objektträger befindliche Eizelle wurde mit einem Tropfen Pronase (Pronase : Wasser = 1 : 1) bedeckt. Nach einer Einwirkungszeit von 10 - 15 Minuten wurde die Eizelle gründlich gereinigt. Die Eizelle wurde wiederholt in einem reinenTropfen Aqua dest. gespült, bis nur noch die saubere Zelle in dem Tropfen schwamm. Dann wurde alle Flüssigkeit so weit wie möglich um die Eizelle herum mit einer Pasteurpipette aufgesogen. Danach wurde das Oolemm mit der Uhrmacherpinzette unter dem Umkehrmikroskop soweit aufgerissen, daß der Zellinhalt auslaufen und das Oolemm entfernt werden konnte. Nach Lufttrocknung erfolgte die Autoradiographie (ONUMA et al., 1968).

3.2.4 Histologische Aufarbeitung der Eizellen

Für die histologische Aufarbeitung wurden die ausgespülten Eizellen mit der Pasteurpipette auf ein Uhrglas gebracht, so daß sie hier in ein wenig Plasma schwammen. Die Flüssigkeitsmenge sollte jedoch nicht mehr als einige Tropfen betragen. Es wurde etwas Thromboplastin-Calcium (Simplastin, Goedecke) zugesetzt (KENNELLY und FOOTE, 1966). Das Thromboplastin-Calcium bindet alle festen Bestandteile, die sich in der Plasmaflüssigkeit befinden zu einem Fibrinklümpchen. Das Fibrinklümpchen wurde eine 1/2 Stunde lang in Essigsäure-Alkohol (1 : 3) fixiert, je 5 - 10 Minuten in der aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 85%, 95%, 95%, 100%, 100%, 100%) dehydriert, fernerhin für 15 Minuten in 100% Alkohol-Toluol (1 : 1), 3 mal für 5 Minuten in Toluol und 3 mal für 20 Minuten im Brutschrank in Paraffin verbracht und dann in Paraffin eingebettet. Von den Klümpchen wurden Serienschnitte (5 μ) für die

Autoradiographie angefertigt. Die entparaffinierten Schnitte (3 mal je 15 Minuten in Xylol entparaffinieren, in der absteigenden Alkoholreihe: 100%, 96%, 70% kurz tauchen, 3 mal in Aqua bidest. entwässern) wurden der Stripping-Film-Methode unterzogen.

3.2.5 Eizellauswertung

Die autoradiographische Auswertung der Eizellen wurde nach unterschiedlichen Gesichtspunkten vorgenommen. Da bei den meisten Eizellen einzelne Schnitte aus technischen Gründen nicht zur Verfügung standen, war eine direkte quantitative Aussage über die Markierungen nur bedingt möglich. Um einen Anhaltspunkt für die quantitative Markierung zu bekommen, wurden von jeweils 5 Eizellen im Einzell-, Zweizell- und Vierzellstadium die Schnitte mit den größten Kernflächen ausgewertet. Von diesen Schnitten wurde die Zahl der Silberkörner über dem Kern und über dem Zytoplasma festgehalten und jeweils die Fläche des Kerns und des Zytoplasmas mit dem Okularmikrometer bestimmt. Dabei wurden die längsten (a) und kürzesten (b) Durchmesser des Zellkerns und des Zytoplasmas ausgemessen und die Fläche (F) nach der Formel: $F = a \cdot b \cdot \pi$ ermittelt. Anschließend wurde die Silberkornzahl pro Flächeneinheit ($100\,\mu^2$) für Zytoplasma und Kern getrennt berechnet.

In einem weiteren Auswertungsgang wurden in allen Schnitten ohne Berücksichtigung der Größe der Zellanschnitte die Silberkörner über Zytoplasma und Zellkern pro Eizelle gesondert ausgezählt und die Markierungen addiert. Bei den geteilten Eizellen wurden die Werte von allen Kernen und dem Zytoplasma der einzelnen Zellen ebenfalls zusammen gezählt, da davon ausgegangen werden mußte, daß die Zahl der Markierungen pro Zygote konstant bleibt.

3.2.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Varianzanalyse und dem t-Test (MUDRA, 1958).

3.3 Versuch zur Spermienmarkierung

Einem Kaninchenbock von 2 kg Körpergewicht wurde im Abstand von 12 Stunden 4 mal je 0,25 mC H^3-Thymidin [Thymidin(methyl-T) 2000 mCi/mM, Firma Buchler] pro kg Körpergewicht intravenös injiziert.
Der Bock wurde nach der letzten Verabreichung von H^3-Thymidin 2 bis 3 mal wöchentlich zur Spermagewinnung herangezogen. Da markierte Spermien frühestens 39 Tage nach der ersten Injektion auftreten, wurde vom 38. Tag bis zum 46. Tag täglich ein Ejakulat gewonnen. Von allen Ejakulaten ab dem 38. Tag wurden zur Sicherheit mindestens 2 Spermienausstriche angefertigt und mit Ausnahme der Präparate vom 41. Tag der Stripping-Film-Methode unterzogen. Um einen Hinweis auf eventuelle Auswirkungen der autoradiographischen Techniken zu erhalten, wurde für die Ausstriche am 41. Tag das Dipping-Verfahren ausgewählt.

3.4 Ergebnisse der Spermienmarkierung

Markierte Spermien wurden frühestens am 40. Tag nach der ersten Injektion von 0,25 ml Tritium-Thymidin ausgeschieden (Abb. 2, Tab. 1). Der Prozentsatz stieg kontinuierlich an. Am 46. Tag p.i. waren 637 von 1000 Spermien markiert. Spermien mit 8 und mehr Markierungen wurden gesondert berücksichtigt (Abb. 2, Tab. 1). Es wurde davon ausgegangen, daß mindestens 8 Markierungen pro Samenzelle vorhanden sein müssen, damit eine eindeutige Aussage über den Markierungserfolg in den geteilten Eizellen gemacht werden kann. Die Anzahl der Spermien mit 8 und mehr geschwärzten Silberkörnchen stieg bis zum 45. Tag an, um danach wieder abzufallen (Abb. 2, Tab. 1). Demnach wurde der günstigste Prozentsatz hochmarkierter Spermien am 45. und 46. Tag eventuell auch noch am 47. Tag oder später nach der erstmaligen H^3-Thymidingabe erreicht. Die Zahl der Spermien mit 8 und mehr geschwärzten Silberkörnchen lag auch in diesen Tagen nur bei 33% (Tab. 1). Es war deswegen angezeigt, die Dosierung im nächsten Versuch für die Kennzeichnung von Zygoten mit H^3-Thymidin markierten Spermien zu erhöhen.

Der Nulleffekt lag für die Stripping-Film-Methode bei 0,0163 und für die Dipping-Methode bei 0,1148. Um unspezfische Markierungen auszuschließen wurde die Grenze für den Nulleffekt bedeutend höher angesetzt. Bei beiden Methoden wurden erst 3 oder mehr Silberkörner pro Spermienkopf als spezifisch, d.h. als markierte Spermien angesehen. Bei dieser Auswertung zeigte sich zwischen den 2 verwendeten autoradiographischen Techniken kein wesentlicher Unterschied.

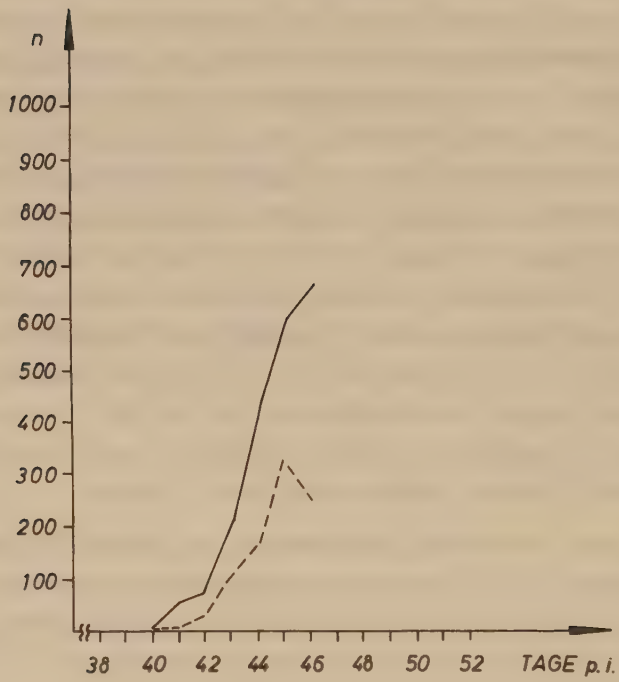


Abb. 2: Zahl der markierten Spermien pro Tag (von 1000 ausgezählten Spermien) nach 4 maliger Injektion von H^3-Thymidin (0, 25 mC/ kg Körpergewicht im Abstand von 12 Stunden) an einem Kaninchenbock

Spermien mit 3 u. mehr geschwärzten Silberkörnern ——

Spermien mit 8 u. mehr geschwärzten Silberkörnern ----

Tab. 1: Autoradiographische Auswertung der Spermienausstriche zur Feststellung der höchsten Spermienmarkierung nach 4 maliger Injektion von H^3-Thymidin (0,25 mC/kg Körpergewicht im Abstand von 12 Stunden)

(1000 ausgezählte Spermien/Tag)

Tage nach Inj. mit H^3-Thymidin	38	39	40	41	42	43	44	45	46
Zahl der markiert. Spermien mit 3 und mehr Silberkörnern									
absolut	-	-	9	64	76	209	458	595	637
%	-	-	0,9	6,4	7,6	20,9	45,8	59,5	63,7
Zahl der markiert. Spermien mit 8 und mehr Silberkörnern									
absolut	-	-	3	6	37	104	177	333	252
%	-	-	0,3	0,6	3,7	10,4	17,7	33,3	25,2
durchschnittliche Silberkornzahl pro Spermium	-	-	0,15	0,75	0,65	1,5	3,41	5,23	5,11

3.5 Befruchtung von Eizellen mit markierten Spermien

3.5.1 Spermienmarkierung und Eizellgewinnung

Um eine intensivere Markierung zu erzielen, wurden zwei männlichen Kaninchen (Bock A, Bock B) von ca. 2 kg Körpergewicht im Abstand von 12 Stunden 4 mal je 1,0 mC/kg Körpergewicht Tritium-Thymidin Thymidin(methyl-T) 2000 mCi/mM, Firma Buchler, Heidelberg i.v. appliziert.
Danach wurde 2 bis 3 mal wöchentlich, vom 28. bis zum 56. Tag nach der ersten Injektion an täglich ein Ejakulat gewonnen. Durch die tägliche Spermagewinnung sollte eine Entleerung des Nebenhodenschwanzes erreicht und dadurch eine Vermischung markierter und nicht markierter Spermien, die den Prozentsatz radioaktiver Samenzellen reduzieren würden, möglichst vermieden werden. Unter Berücksichtigung der Dauer der Nebenhodenpassage mußte der Beginn der täglichen Spermagewinnung mindestens 10 Tage vor dem ersten Auftreten markierter Spermien, also dem 28. Tag, festgelegt werden.
Von den Ejakulaten des 38. bis 56. Tages wurden autoradiographische Präparate untersucht.
Mit den Ejakulaten des 45. - 47. Tages wurden 19 Kaninchen besamt, die vorher zur Superovulation vorbereitet waren.

3.6 Ergebnisse der Spermien- und Eizellmarkierung

3.6.1 Ergebnisse der Spermienmarkierung

Die Markierung mit Tritium-Thymidin hatte auf die Beschaffenheit (Volumen, Motilität, Morphologie und Dichte) des Sperma keinen Einfluß. Als Folge der täglichen Spermagewinnung nahm die Dichte gegen Ende des Versuchs stark ab (Tab. 2 und 3).

Von Bock A wiesen bereits am 38. Tag, dem Beginn der autoradiographischen Untersuchungen, 9,4% der Spermien eine Markierung, d.h. 3 oder mehr Silberkörner,auf, während bei Bock B zu diesem Zeitpunkt erst 1,6% der Spermien markiert waren.

Das Maximum der markierten Spermien differierte bei den beiden Böcken geringfügig. Es lag bei Bock A mit 90,0% am 51. Tag, bei Bock B mit 91,6% am 49. Tag. Zwischen den einzelnen Tagen und zwischen den Ejakulaten der beiden Böcke waren individuelle Schwankungen der Markierungen festzustellen (Tab. 4 und 5, Abb. 3).

Die größte Zahl hochmarkierter Spermien, d.h. Samenzellen mit acht und mehr Silberkörnern, wurde bei Bock A mit 85,2% am 51. Tag und bei Bock B mit 94,4 % am 48. Tag p.i. erreicht (Tab. 4 und 5, Abb. 4).

Die durchschnittliche Anzahl der Silberkörner pro Spermium schwankte ebenfalls bei den beiden Böcken von Tag zu Tag. Dieses Maximim wies Bock A mit 27,3 Markierungen pro Spermium am 49. Tag und Bock B mit 25,7 Silberkörner pro Spermium am 44. Tag auf (Tab. 4 und 5, Abb. 5).

Tab. 2: Die Beschaffenheit der Ejakulate von Bock A nach 4 maliger Injektion von H^3-Thymidin (1,0 mC/kg Körpergewicht im Abstand von 12 Stunden)

Tag nach der 1.H-3-Injektion	Volumen (ml)	Vorwärts-bewegung	Pathol. Formen insgesamt, %	Dichte 10^3 Sp./mm^3
4	0,5	75	14	568
8	0,5	20	18,5	85
12	0,4	0	24,9	34
15	1,0	80	14,8	186
20	0,8	70	23,4	222
26	0,4	0	0	9
27	0,8	75	35,0	966
28	0,6	80	26,1	546
29	0,5	65	27,0	720
32	0,4	50	29,9	8
33	0,7	75	17,9	230
37	0,5	55	10,8	266
38	0,7	60	7,5	420
39	0,5	65	23,6	288
40	0,6	40	3,3	288
41	0,6	60	7,2	255
42	0,6	55	5,2	277
43	0,5	70	4,0	55
44	0,5	75	4,2	80
45	0,7	65	3,8	355
46	0,5	60	6,6	122
47	0,4	75	6,3	133
48	0,5	70	9,9	144
49	0,5	65	8,6	22
50	0,8	70	8,4	14
51	0,4	60	5,3	33
52	0,5	50	10,0	55
53	0,5	60	6,7	22
54	0,4	70	6,9	20
55	0,5	65	12,9	88
56	0,6	70	13,3	11

Tab. 3: Die Beschaffenheit der Ejakulate von Bock B nach 4 maliger Injektion von H^3-Thymidin (1,0 mC/kg Körpergewicht im Abstand von 12 Stunden)

Tag nach der 1.H-3-Injektion	Volumen (ml)	Vorwärts-bewegung	Pathol. Formen insgesamt, %	Dichte 10^3 Sp./mm^3
4	1,0	70	26	450
8	0,5	75	7,6	206
12	1,2	80	9,0	320
15	0,8	60	17,0	120
20	0,6	5	2,9	566
26	1,0	60	6,0	366
27	0,9	80	6,3	166
28	1,1	0	8,4	204
29	0,5	80	8,3	412
32	0,7	75	13,9	177
33	1,0	20	4,9	255
37	1,0	60	3,0	344
38	0,8	70	8,2	234
39	0,6	70	3,3	422
40	0,7	70	8,0	300
41	0,8	75	6,9	288
42	1,0	75	4,0	300
43	1,0	0	5,4	60
44	1,2	70	4,5	55
45	1,0	70	6,5	44
46	0,8	70	8,9	77
47	0,8	70	7,2	80
48	0,9	75	8,6	100
49	0,7	70	8,3	155
50	1,1	70	7,5	99
51	0,9	70	5,4	120
52	1,0	75	5,1	133
53	0,8	80	7,3	19
54	0,8	70	8,5	23
55	0,9	80	16,0	22
56	0,5	80	17,9	8

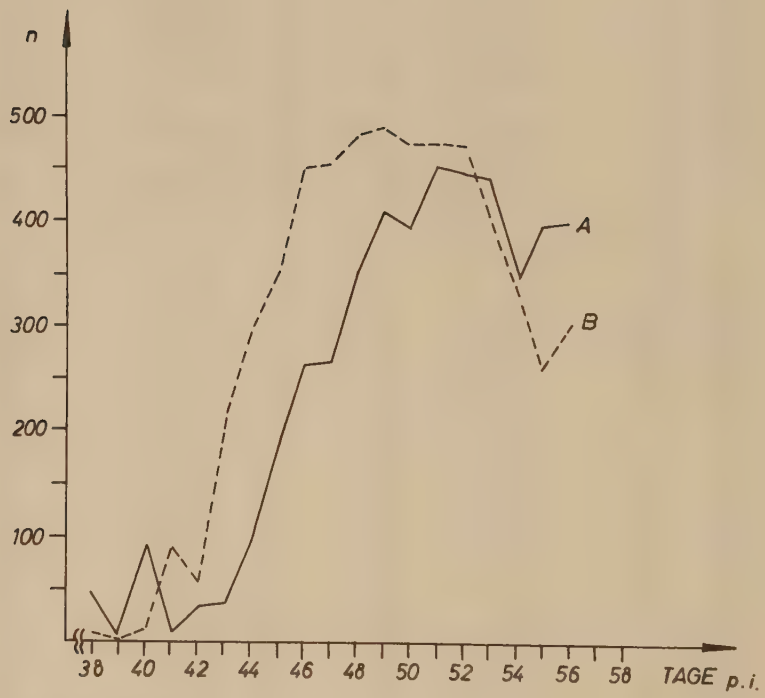


Abb. 3: Zahl der markierten Spermien mit 3 und mehr Markierungen nach 4 maliger Injektion von H^3-Thymidin (1,0 mC/kg Körpergewicht im Abstand von 12 Stunden) an 2 Kaninchenböcken (von jeweils 500 ausgezählten Spermien)

Bock A —— Bock B ----

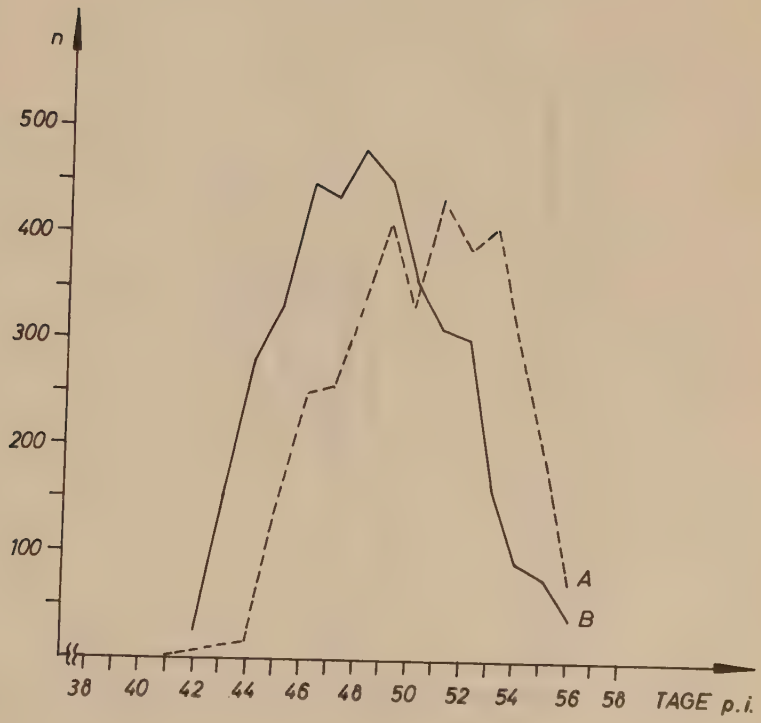


Abb. 4: Zahl der Spermien mit 8 und mehr Markierungen (von 500 ausgezählten Spermien) nach 4 maliger Injektion von H^3-Thymidin (1,0 mC/kg Körpergewicht im Abstand von 12 Stunden) an 2 Kaninchenböcken

Bock A ——— Bock B ----

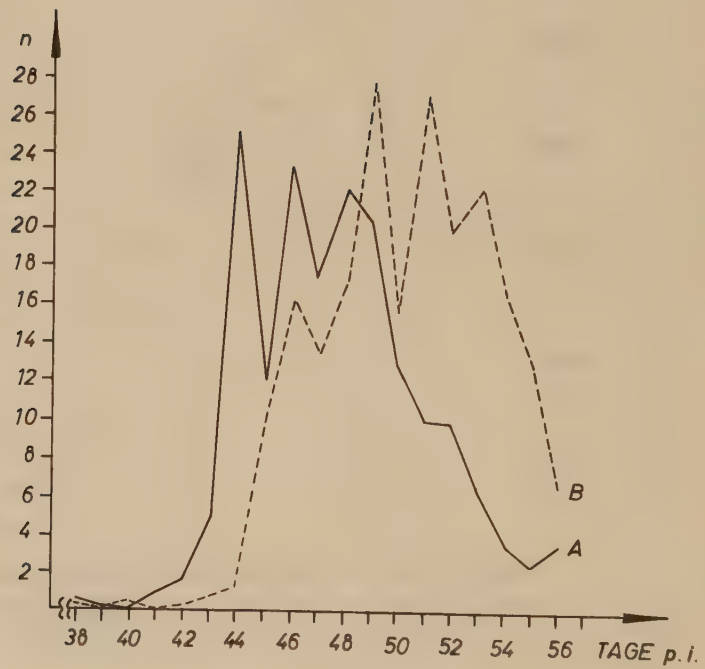


Abb. 5: Durchschnittliche Zahl der Markierungen pro Spermium und Tag
(von 500 ausgezählten Spermien) nach 4 maliger Injektion von H^3-Thymidin (1,0 mC/kg Körpergewicht im Abstand von 12 Stunden) an zwei Kaninchenböcken
Bock A ——— Bock B ----

Tab. 4: Autoradiographische Auswertung der Spermienausstriche von Bock A

(500 ausgezählte Spermien)

Tage nach 1. Inj. mit H^3-Thymidin	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
Zahl der markiert. Spermien mit 3 u. mehr Silberkörnern																			
absolut	47	13	92	16	38	39	99	185	263	268	359	422	393	450	439	430	360	424	425
%	9,4	2,6	18,4	3,2	7,6	7,8	19,8	37,0	52,6	53,6	71,8	84,8	78,6	90,0	87,8	86,0	72,0	84,8	85,0
Zahl der markiert. Spermien mit 8 u. mehr Silberkörnern																			
absolut	1	-	-	-	-	13	20	143	240	252	325	404	323	426	388	414	300	210	95
%	0,2	-	-	-	-	2,6	4,0	28,6	48,0	50,4	65,0	80,8	64,6	85,2	77,6	82,8	60,0	42,0	19,0
durchschnittliche Silberkornzahl pro Spermium	0,32	0,08	0,63	0,1	0,26	0,85	1,63	10,34	16,01	13,87	16,81	27,27	15,85	26,89	20,55	22,65	16,74	13,72	6,89

Tab. 5: Autoradiographische Auswertung der Spermienausstriche von Bock B

(500 ausgezählte Spermien)

Tage nach 1. Inj. mit H^3-Thymidin	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
Zahl der markiert. Spermien mit 3 u. mehr Silberkörnern																			
absolut	8	4	14	86	58	214	290	350	458	462	480	488	470	468	466	402	304	274	303
%	1,6	0,8	2,8	17,2	11,6	42,8	58,0	70,0	91,6	92,4	96,0	97,6	94,0	93,6	93,2	80,4	60,8	54,8	60,6
Zahl der markiert. Spermien mit 8 u. mehr Silberkörnern																			
absolut	-	-	-	-	28	154	282	332	444	434	472	442	360	320	302	176	118	94	59
%	-	-	-	-	5,6	30,3	56,4	66,4	88,8	86,8	94,4	88,4	72,0	64,0	60,4	35,2	23,6	18,8	11,8
durchschnittliche Silberkornzahl pro Spermium	0,56	0,24	0,09	0,63	1,84	4,8	25,66	12,29	23,47	17,39	22,54	20,79	13,12	10,03	9,57	7,21	4,26	3,46	4,04

3.6.2 Anzahl, Morphologie und Markierung der gewonnenen Eizellen

Von den 19 Kaninchen konnten 442 Eizellen ausgespült und davon 197 in den Serienschnitten verarbeitet und ausgewertet werden. Alle waren morphologisch unverändert. Von den insgesamt 165 markierten Ova befanden sich 89 im Einzellstadium, 15 im Zweizell-, 53 im Vierzell- und 8 im Achtzellstadium. Silberkörner über den Kern wiesen 32 Eizellen im Einzell-, 15 im Zweizell-, 53 im Vierzell- und 8 im Achtzellstadium auf (Tab. 6).

Die Markierungen über den Kernen der geteilten Zygoten war stärker als bei den ungeteilten Eizellen. Dieser Befund ergab sich sowohl bei der Auswertung pro Zellkernschnitt ($P \leq 0,01$; Tab. 7) als auch beim Vergleich der Markierungen der Gesamtkerne in den verschiedenen Teilungsstadien ($P \leq 0,01$; Tab. 8). Zwischen den 1-, 4- und 8-Zellstadien zeigte die Intensität der Markierung keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$; Tab. 8 und 8).
Silberkörner wurden auch über dem Zytoplasma aller Eizellen mit Markierungen über dem Kern, unabhängig vom Entwicklungsstadium, gefunden. Daneben konnten in 57 Ova im Einzellstadium, deren Kern keine Markierung aufwies, ebenfalls Silberkörner über dem Zytoplasma ermittelt werden, so daß in diesem Stadium insgesamt 89 Zellen eine Markierung im Zytoplasma hatten.
Die Gesamtzahl der Silberkörner über dem Zytoplasma war in allen Entwicklungsstadien außer dem 8-Zellstadium ($P > 0,05$) größer als in den dazugehörigen Zellkernen ($P \leq 0,01$; Tab. 9).
Wurde jedoch die Zahl der Silberkörner wegen der unterschiedlichen Ausdehnung von Zytoplasma und Kern auf die Flächeneinheit bezogen, so war die Markierung der Kerne in allen untersuchten Stadien (1-, 2-, 4-Zellstadium) höher als im Zytoplasma ($P \leq 0,01$; Tab. 10).

Tab. 6: Anzahl der ausgespülten und untersuchten Eizellen sowie der Eizellen mit Markierungen über dem Kernn in den verschiedenen Entwicklungsstadien

Kan. Nr.	Insemination Bock	Zahl der ausgesp. Eizellen	Zahl der unters. Eizellen	Anzahl der Eizellen mit Markierungen über den Kernen			
				1-Zell	2-Zell	4-Zell	8-Zelll
1	A	26	18	1	-	-	-
2	A	12	9	5	-	-	-
3	A	34	15	6	-	-	-
4	B	15	8	4	-	-	-
5	B	17	15	-	6	7	-
6	B	23	15	3	-	-	-
7	B	26	19	4	4	1	-
8	A	20	9	2	-	-	-
9	A	7	-	-	-	-	-
10	A	17	9	2	-	-	-
11	B	32	17	3	1	-	-
12	B	20	9	-	2	5	1
13	B	51	22	-	-	22	-
14	B	14	10	-	-	10	-
15	A	7	2	1	-	-	-
16	B	26	9	-	-	7	1
17	B	43	2	1	-	-	-
18	B	18	1	-	-	-	1
19	B	34	8	-	2	1	5
		442	197	32	15	53	8 insgesamt

Die Insemination der Kaninchen 1 - 7 wurde mit Sperma vom 45. Tag nach der 1. H^3-Thymidin-Injektion vorgenommen, die der Kaninchen 8 - 14 mit Sperma des 46. Tages und der Rest (15-19) mit Sperma vom 47. Tag durchgeführt.

Tab. 7: Markierungen pro Schnitt der Eizellkerne ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) in 3 verschiedenen Entwicklungsstadien (1-, 2-, 4-Zellstadium)

Stadium	n	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	Signifikanz der Differenz zu		
				1-Zell	2-Zell	4-Zell
1-Zell	5	2,0	0,55	-	-16,6**	-17,2**
2-Zell	5	18,6	4,13	-	-	-0,6
4-Zell	5	19,2	2,31	-	-	-

** $P \leq 0,01$

Tab. 8: Durchschnittliche Gesamtzahl der Markierungen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) über allen Kernen einer Zygote vom 1 - 8 Zellstadium

Stadium	n	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	Signifikanz der Differenz zu		
				2-Zell	4-Zell	8-Zell
1-Zell	32	8,13	1,19	25,54**	-29,10**	28,63**
2-Zell	15	33,67	5,02	-	-3,86	-3,08
4-Zell	53	37,53	2,18		-	0,78
8-Zell	8	36,75	3,29			-

** $P \leq 0,01$

Tab. 9: Gesamtzahl der Silberkörner über dem Kern und über dem Zytoplasma der Eizellen

Stadium	Ova	Kerne: Zahl der Silberkörner																			
	n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	> 20
1-Zell	32	-	1	-	6	5	7	3	1	4	-	-	-	-	3	-	-	-	1	-	-	1
2-Zell	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	-	1	-	-	-	11
4-Zell	53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	-	-	1	1	1	47
8-Zell	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	7

Stadium	Ova	Zytoplasma: Zahl der Silberkörner										
	n	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	> 100
1-Zell	89	2	8	12	7	5	10	13	8	7	6	11
2-Zell	15	-	1	3	4	2	2	1	1	-	-	1
4-Zell	53	1	8	15	12	5	4	2	4	-	1	1
8-Zell	8	-	3	1	3	1	-	-	-	-	-	-

Die Differenz der Silberkörner über dem Kern zur Zahl der Silberkörner über dem Zytoplasma ist im Ein-, Zwei- und Vier-Zellstadium signifikant ($P \leq 0,01$).

Tab. 10: Vergleich der Markierungen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) im Zellkern und im Zytoplasma pro Flächeneinheit ($100\,\mu^2$) in 3 verschiedenen Zellstadien (1-, 2-, 4-Zellstadium)

Stadium	n	Zytoplasma	Kern	Signifikanz der Differenz
1-Zell	5	$0,24 \pm 0,06$	$2,75 \pm 0,72$	$P \leq 0,01$
2-Zell	5	$0,26 \pm 0,04$	$3,44 \pm 0,43$	$P \leq 0,01$
4-Zell	5	$0,33 \pm 0,07$	$3,82 \pm 1,47$	$P \leq 0,01$

4. DISKUSSION:

Die Untersuchungen sollten zur Klärung der Frage beitragen, ob es möglich ist, Spermien so hoch und gleichmäßig mit H^3-Thymidin zu markieren, daß die Markierung auch noch nach der Befruchtung in der Zygote nachgewiesen werden kann. Dabei war zu überprüfen, wie weit eine derartige Kennzeichnung von Zygoten durch Spermien außer im Einzellstadium, auch noch im Zwei-, Vier- und Achtzellstadium feststellbar ist. Es ist zu erwarten, daß der Nachweis der Markierung in mehrzelligen Zygoten im Vergleich zu befruchteten Eizellen im Einzellstadium erhöhte Schwierigkeiten bereitet, da es durch die Teilungsvorgänge zu einer Reduzierung der radioaktiven Partikel pro Kern kommen kann.

Alle Autoren, die bisher Radioisotope zur Untersuchung der Spermatogenese benutzten, haben, gemäß ihrer Aufgabenstellung, immer nur eine einmalige Injektion von Tritium-Thymidin verwendet, um die Lebensdauer der einzelnen Zellgenerationen des Keimepithels festlegen zu können (ORTAVANT, 1956; SIRLIN und EDWARDS, 1958; CLERMONT et al., 1959; KOEFOED-JOHNSON, 1959; HELLER und CLERMONT, 1963; YASSEN und FOOTE, 1963; AMANN et al., 1965; HUCKINS, 1965; ORGEBIN-CRIST, 1965; SWIERSTRA und FOOTE, 1965; HILSCHER et al. 1966; HUNT und FOOTE, 1967; TAKEDA et al., 1968). Dabei wurden Dosierungen von 1 - 3 mC H^3-Thymidin pro kg Körpergewicht injiziert. Nach einer einmaligen Applikation enthalten diejenigen Spermien am meisten H^3-Thymidin, die das Isotop als primäre Spermatozyten aufnahmen, weil bei allen jüngeren Zellgenerationen noch mehr Teilungsvorgänge ablaufen. Bei den hier durchgeführten Versuchen wurden 4 Injektionen im Abstand von 12 Stunden verabreicht, um möglichst viele primäre Spermatozyten während der DNS-Synthese zu markieren. Mit der 2. - 4. H^3-Thymidingabe wurden zusätzlich alle primären Spermatozyten erfaßt, die durch die vorhergehenden Injektionen bereits im Spermatogonienstadium H^3-Thymidin aufgenommen hatten.

Für die Wahl des Abstandes zwischen den Injektionen wurden Beobachtungen von HILSCHER und HILSCHER (1969) an der Ratte über die prämeiotische Ruhephase, kurz Prämeiose genannt, auf das Kaninchen übertragen. HIL-

SCHER und HILSCHER (1969) erwähnen, daß die Dauer der Prämeiose gleich dem Zeitintervall zwischen dem Ende der B-Mitosen und dem Auftreten der zeitlich nachfolgenden letzten Ruhe-Phasen-Kerne der primären Spermatozyten an derselben Stelle des Tubulus ist. Diese Spanne ist nahezu identisch mit dem Zeitintervall zwischen dem Ende der B-Mitosen und dem Ende der zeitlich nachfolgenden A-Mitosen. Das Zeitintervall Δt ist gleich der Differenz der Generationszeiten von A_1 und B. Das bedeutet für die Ratte:

$$\Delta t = T(A_1) - T(B) = 99 \text{ Stunden},$$

wobei T die Generationszeit ist.

Die von SWIERSTRA und FOOTE (1965) ermittelten Werte für die Generationszeiten beim Kaninchen ergeben nach dieser Formel das Zeitintervall von $\Delta t = 3,4 - 1,1 = 2,3$ Tage. Die Wiederholung der Injektionen im Intervall von 12 Stunden gewährleistet auch unter diesem Gesichtspunkt die Kennzeichnung möglichst aller Zellen in der prämeiotischen DNS-Synthese während der Generationszeit von ca. 2 Tagen.

Neben der spezifischen Generationszeit waren für die hier angestrebte Kennzeichnung der Samenzellen die besonderen Verhältnisse im Nebenhoden zu berücksichtigen. ORGEBIN-CRIST (1965) hat die Isotopenmarkierung der Spermien verwendet, um deren Wanderung durch den Nebenhoden zu untersuchen. Sie stellte dabei fest, daß nach einmaliger H^3-Thymidin-Gabe im Ductus epididymidis die markierten Spermien wellenförmig im Abstand von 2 Tagen auftreten. Die erste Spermienwelle stammt nach ihrer Meinung von den markierten primären Spermatozyten, die zweite von den B-Spermatogonien und die folgenden mit schwächer markierten Spermien aus den jüngeren Spermatogoniengenerationen.

Weiterhin teilte ORGEBIN-CRIST (1965) mit, daß im Nebenhoden durch Muskelkontraktionen und durch das Flimmerepithel eine Mischung von Spermien verschiedenen Alters eintritt. Dadurch werden mit den Ejakulaten die Spermien nicht genau in der Reihenfolge der Markierung, die sie während der Spermatogenese erhalten, ausgeschieden.

Das Zusammenwirken von prämeiotischer Ruhepause und Mischungseffekt im Nebenhoden erschwert eine intensive Markierung aller Spermien außerordent-

lich. So waren in den hier durchgeführten Versuchen trotz der wiederholten Injektionen noch gewisse tägliche Schwankungen in der durchschnittlichen Zahl an Silberkörnern pro Spermium zu beobachten, die als Folge dieser Erscheinungen angesehen werden müssen. Bei den beiden hier verwendeten Böcken traten in der durchschnittlichen Zahl an Silberkörnern pro Spermium 3 Gipfel im Abstand von 2 Tagen auf, die den von ORGEBIN-CRIST (1965) beschriebenen Wellen entsprechen (Abb. 5). Für die Beurteilung des Markierungserfolges wurde neben der durchschnittlichen Zahl an Silberkörnern aller untersuchten Samenzellen auch der Prozentsatz markierter Spermien herangezogen. Der Nulleffekt lag bei beiden hier angewandten autoradiographischen Methoden, weit unter 1,0. Für die beabsichtigte Kennzeichnung von Zygoten war aus den später dargestellten Gründen heraus eine möglichst hohe Markierung anzustreben. Deshalb wurde bei diesen und auch bei den folgenden Versuchen erst eine Markierung mit 3 oder mehr Silberkörnern als spezifisch angesehen. Spermien mit 8 und mehr Silberkörnern wurden besonders registriert. Geht man davon aus, daß nach der Amphimixis bei den folgenden Mitosen eine gleichmäßige Verteilung des H^3-Thymidin auf die Tochterkerne erfolgen kann, so wären nach Befruchtung mit einem derart hoch markiertem Spermium im 2-Zellstadium wenigstens noch 4 Silberkörner aufzufinden. Zur Kennzeichnung von Zygoten im 4- oder 8-Zellstadium sind aus diesen theoretischen Überlegungen heraus nur Spermien mit einer Markierung von 8 oder mehr Silberkörnern von Interesse.

Schon der Vorversuch zeigte (Tab. 1), daß der höchste Prozentsatz markierter Spermien mit 63,7% (46. Tag) nicht zum gleichen Zeitpunkt auftrat wie das Maximum bei der durchschnittlichen Zahl an Silberkörnern pro Spermium mit 5,23% (45. Tag) und der größte Anteil sogenannter hoch markierter Spermien, d.h. Samenzellen mit 8 oder mehr Silberkörnern mit 33,3% (45. Tag). Dies ist auf Grund des H^3-Thymidineinbaus in Spermatogonien und primäre Spermatozyten erklärbar. Mit der letzten H^3-Thymidinapplikation werden, wie von ORGEBIN-CRIST (1965) nach einmaliger Injektion beschrieben, jüngere Spermatogoniengenerationen markiert, die durch weitere Teilungen zu einem späteren Ausscheiden schwächer markierter Spermien führen.

Bei dem Vorversuch wurden die Stripping und die Dipping-Methode angewendet. Von einem erhöhten Nulleffekt bei der Dipping-Methode abgesehen, waren die Ergebnisse vergleichbar und wurden deshalb zusammen dargestellt (Tab. 1). Für die weiteren Untersuchungen fand wegen des geringeren Nulleffektes nur noch die Stripping-Methode Verwendung.

Im folgenden Experiment wurde die Untersuchungszeit von 46 auf 56 Tage p.i. ausgedehnt, da im ersten Versuch mit dem 46. Tag nicht bei allen Kriterien das Maximum der Werte erfaßt werden konnte.

Bei den zwei verwendeten Böcken zeigten sich bei allen Merkmalen für die Intensität der Markierung von Samenzellen individuelle Variationen. Der Prozentsatz aller markierter Spermien erreichte bei Bock A erst am 49. Tag Höchstwerte, die dann etwa als Plateau bis zum 56. Tag gehalten wurden, während bei Bock B dies bereits am 46. Tag eintrat und nach dem 52. Tag wieder ein deutliches Absinken registriert werden konnte. Auch bei den hoch markierten Spermien und bei der durchschnittlichen Anzahl an Silberkörnern pro Samenzelle lag eine individuell bedingte Phasenverschiebung um ca. 3 Tage vor. Für diese Merkmale wurde das Plateau bei Bock A etwa am 49. Tag und bei Bock B etwa am 46. Tag ermittelt. Eine Ursache für diese individuellen Schwankungen wurde nicht gefunden.

Bei beiden Böcken waren zwischen dem 45. und 56. Tag bzw. dem 45. und 47. Tag 37,0 - 97,6% bwz. 37,0 - 92,4% Spermien markiert, für hoch markierte Spermien lagen die Zahlen im entsprechenden Zeitabschnitt bei 11,8 - 88,8% bzw. 28,6 - 88,8% und für die durchschnittliche Zahl an Silberkörnern bei 3,46 - 26,89% bzw. 13,87 - 23,47%.

Für die Insemination wurde nach den Ergebnissen des Vorversuchs das Sperma vom 45., 46. und 47. Tag ausgewählt. Bei den Ejakulaten vom 48. Tag p.i. und später bestand die Gefahr, daß wegen der täglichen Spermagewinnung die Dichte stark abnahm und damit der Befruchtungserfolg in Frage gestellt würde. Die H^3-Thymidin-Markierung selbst beeinträchtige die Spermaqualität nicht (Tab. 2 und 3). Durch die individuellen Schwankungen wurde bei Bock A die Periode der intensivsten Markierung nicht ausgenützt. Die Ergebnisse der Autoradiographie lagen, bedingt durch das langwierige Verfahren, erst

einige Wochen nach der Verwendung des Spermas zur Insemination vor. Eine Tiefgefrierkonservierung des Samens nach STRANZINGER et al. (1971) wurde nicht vorgenommen, weil Übersichtsversuche Hinweise für eine doch erhebliche Beeinträchtigung der Motilität und damit einer Minderung des Befruchtungsvermögens erbrachten.

Bei der Aufbereitung der Ova für die Autoradiographie führte beim Vorversuch das mechanische Eröffnen des Oolemms mit Uhrmacherpinzetten zu keinen brauchbaren Ergebnissen. Es kam wohl zu einem Ausfließen des Inhaltes, jedoch wurden die Zellen bereits im Oolemm durch den für die Vorbehandlung unbedingt erforderlichen Pronase-Zusatz so stark zerstört, daß keine Strukturen mehr erkennbar waren.
Im Hauptversuch wurden die Eizellen deshalb für die Autoradiographie in Paraffin eingebettet und in Serie geschnitten. Bei den einzelnen Schritten dieses Verfahrens, vor allem bei den wiederholten Reinigungsspülungen und insbesondere dem Aufnehmen in Fibrinklümpchen, ging ein erheblicher Anteil von Zellen verloren. Teilweise reichte auch die Konsistenz des Fibrinklümpchens im Paraffin nicht aus, so daß beim Schneiden ganze Präparate ausbrachen. Diese Komplikation ergab sich relativ häufig auch bei einzelnen Eizellen. Komplette Serienschnitte lagen deshalb nur von einem Teil aller Präparate vor. Von den 442 ausgespülten Ova konnten histologisch und autoradiographisch nur 197 bearbeitet und beurteilt werden. Diese Ergebnisse decken sich im Großen und Ganzen mit denen von KOPECNY et al. (1962), die auf Grund der Histologie von 81 befruchteten Eizellen nur acht mit markiertem Pronucleus auswerten konnten.
Die quantitative Auswertung der Autoradiographie erfolgte an Einzelschnitten mit dem größten Kerndurchmesser. Die Absolutzahlen der Silberkörner pro Eizelle können nur als Anhaltspunkte für eine quantitative Markierung betrachtet werden. Die großen Unterschiede zwischen Kern und Zytoplasma und zwischen den Entwicklungsstadien lassen aber doch eindeutige Aussagen zu. Markierungen im Zytoplasma aller Entwicklungsstadien und insbesondere bei 57 Ova im Einzellstadium, über deren Kern keine Silberkörner zu beobachten waren, weisen darauf hin, daß sie nicht mit der Kernsubstanz eines

Spermiums direkt übertragen wurden. Nach FOOTE (1959) und NEBEL et al. (1960) wird Tritium-Thymidin während der Spermatogenese nur in den Kern eingebaut. Die Markierungen im Zytoplasma können durch Stoffwechselabbauprodukte, Verunreinigungen (sog. "Impurities") und/oder freies, nicht eingebautes H^3-Thymidin bedingt sein (DIAB und ROTH, 1970). Für eine solche unspezifische Ursache spricht die relativ geringe Zahl an Silberkörnern, die besonders deutlich bei einer Relation zur Flächeneinheit erkennbar ist (Tab.9 und 10). Eine Übertragung von freiem H^3-Thymidin erscheint bei dieser Versuchsanordnung unwahrscheinlich, weil das Isotop nicht den weiblichen Tieren, sondern mehr als 6 Wochen vor der Insemination den Böcken injiziert wurde.

Einen eindeutigen Hinweis für die spezifische Markierung der Kerne durch Spermien bei der Befruchtung bringt das Zahlenverhältnis markierter und nicht markierter Ova getrennt nach Ein- und Mehrzellstadium. Im Einzellstadium hatten von 89 Ova 32, das sind ca. 36%, Markierungen über dem Kern, von 108 im Mehrzellstadium dagegen 76 oder ca. 70%. Die unmarkierten Einzellstadien rekrutieren sich aus unbefruchteten und befruchteten Eizellen. Eine Differenzierung war bei diesem Untersuchungsverfahren nicht möglich. Da eine Markierung aller Spermien durch die 4 malige H^3-Thymidin-Applikation nicht eintrat, muß erwartet werden, daß ein bestimmter Prozentsatz aller Ova mit nicht markierten Spermien befruchtet wurde. Im Mehrzellstadium ist naturgemäß nur mit diesem Anteil nicht markierter Zygoten zu rechnen.

Die Markierungen über den Kernen heben sich erst dann eindeutig von den unspezifischen Erscheinungen am Zytoplasma ab, wenn die Zahl der Silberkörner auf die Flächeneinheit bezogen wird, weil das Zytoplasma ein Vielfaches der Fläche des Kernes einnimmt. Für das Achtzellstadium war diese Berechnung wegen zu geringen Materials nicht durchführbar. Bei den übrigen Entwicklungsstadien war die Differenz der Silberkörnerzahl über Kern und Zytoplasma signifikant ($P \leq 0,01$; Tab. 10).

Ein besonderes Phänomen stellt das Ansteigen der Markierungsintensität über dem Kern vom Ein- zum Mehrzellstadium dar ($P \leq 0,01$; Tab. 7 und 8). In erster Linie muß daran gedacht werden, daß die Eizellen mit Spermien be-

fruchtet wurden, die unterschiedlich markiert waren. Zygoten, die sich beim Ausspülen aus dem Eileiter im Mehrzellstadium befanden, müssen früher befruchtet worden sein als diejenigen im Einzellstadium. Es müßte dann angenommen werden, daß intensiver markierte Spermien früher zur Befruchtung gelangten, wofür kein einleuchtender Grund zu erkennen ist. Eine andere Ursache für diese Erscheinung könnte der Einbau von DNS-Bruchstücken in die Kerne der sich teilenden Zygoten aus Spermien sein, die nicht befruchteten. Nach der Begattung oder Insemination gelangen einige Tausend Samenzellen an den Ort der Befruchtung im Ovidukt. Um die Eizellen finden sich stets zahlreiche Spermien. Von diesen dringen einige in den perivitellinen Raum ein. Die nicht befruchtenden Samenzellen werden dort abgebaut. Dabei könnten DNS-Bestandteile oder -Stoffwechselprodukte frei und bei den folgenden Mitosen in die Tochterkerne der Eizelle aufgenommen werden.
Die Zeit, in der DNS-Bestandteile eingebaut werden können, ist sehr kurz bemessen. Sie beschränkt sich auf die Spanne, vom Abbau der Spermien im Eileiter oder perivitellinen Raum, bis zu der Abspaltung des Tritiums von der Base Thymidin oder bis zur Resorption aller lytischen Spermiensubstanzen. Folglich kann auch die Zahl der Markierungen nur bis zu einem bestimmten Teilungsstadium ansteigen, um dann konstant zu bleiben.
Die Tatsache, daß eine sich mitotisch teilende Zelle aus einem sie umgebenden Medium H^3-Thymidin aufnimmt, beschreiben DENNIS und WAKE (1966). Sie kultivierten Bacillus subtilis auf einem Nährboden, der H^3-Thymiden enthielt. Dabei nahmen die Bakterien soviel H^3-Thymidin auf, daß sich die Chromosomen durch ihren hohen Thymidingehalt fadenförmig auf dem Autoradiogramm darstellten.

Eine endgültige Aussage, woher die Markierungen über dem Zytoplasma und die vermehrte Anzahl an Markierungen über den Kernen der stärker geteilten Eizellen stammt, läßt sich vermutlich nur anhand eines Versuchs mit Doppelmarkierungen machen. Dies bedeutet, daß weibliche Tiere mit Mischsperma von zwei unterschiedlich markierten Böcken (Bock I mit H^3 und Bock II z.B. mit C^{14}) besamt werden müßten. Sind dann in den Kernen der befruchteten Eizellen regelmäßig beide Isotope gleichzeitig nachweisbar, so könnte dies

als Hinweis dafür angesehen werden, daß die Eizelle DNS von Spermien unterschiedlicher Herkunft enthält. In Ausnahmefällen müßte bei dieser Versuchsanordnung auch an eine sich sehr seltene Befruchtung mit 2 Spermien und damit an einen triploiden Chromosomensatz gedacht werden.
Nachdem bei den hier vorgenommenen Versuchen die Differenz in der Gesamtzahl an Silberkörnern zwischen den Ein- und Mehrzellstadien so eindeutig und der mittlere Fehler des Mittelwertes relativ klein ist (Tab. 8), scheint die zweite Hypothese, nämlich der Einbau von DNS-Bruchstücken als Erklärung für diese Erscheinung wahrscheinlicher.
Als Schlußfolgerung kann herausgestellt werden, daß eine Kennzeichnung der Zygoten bis zum Achtzellstadium durch Befruchtung mit H^3-Thymidin markierten Spermien möglich ist. Damit würde sich für viele Problemstellungen im Zusammenhang mit der Befruchtung, z.B. durch Verwendung von markierten und unmarkierten Spermien je eines Vatertieres, an der Zygote bereits ein direkter Nachweis führen lassen, welches Sperma bei der Amphimixis beteiligt war. Diese Markierung würde Untersuchungen an frühesten Entwicklungsstadien erlauben, wie sie analog bedeutend später durch die Blutgruppenidentifizierung, durch sogenannte erblich bedingte Kennfarben für Haare usw. möglich sind.
Die Spezifität der Kennzeichnung ausschließlich durch das befruchtende Spermium ist allerdings auf Grund der intensiveren Markierung im Mehrzellstadium noch nicht eindeutig gesichert. Das Ergebnis der vorgeschlagenen Abklärung mit einer Doppelmarkierung wird auch dann von besonderem Interesse sein, wenn keine spezifische Markierung durch das befruchtende Spermium eintritt. Es muß dann bei den ersten Mitosen mit einer Beteiligung von DNS oder deren Bausteinen aus Samenzellen gerechnet werden, die die Eizellen nicht befruchteten. Der starke Unterschied in der Markierung zwischen Ein- und Mehrzellstadium läßt vermuten, daß es sich dabei eher um einen gezielten Prozeß, als um eine zufällige Markierung durch Abbauprodukte von Spermien aus dem Eileiter handelt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Mit Hilfe der Autoradiographie wurde an Kaninchen untersucht, ob Spermien mit H^3-Thymidin so zu markieren sind, daß an Zygoten die Befruchtung durch diese Samenzellen nachgewiesen werden kann.

2. Eine viermalige i.v. Applikation von je 1 mC H^3-Thymidin pro kg Körpergewicht im Abstand von 12 Stunden führte, bei täglicher Spermagewinnung ab dem 38. Tag, zwischen dem 45. und 56. Tag nach der ersten Injektion zur stärksten Markierung der Spermien. Während dieser Zeit zeigten von 500 pro Ejakulat beurteilten Spermien 37,0 - 92,4% mehr als 3 Silberkörner, die als unterste Grenze einer spezifischen Markierung angesehen wurden. Eine starke Markierung mit 8 oder mehr Silberkörnern wurde in dieser Zeit bei 28,6% bis 88,8% der Spermien gefunden.

3. Mit markierten Spermien zweier Böcke vom 45., 46. und 47. Tag nach der ersten H^3-Thymidin Injektion, wurden 19 Kaninchen nach Superovulation besamt. Von 442 ca. 28 bis 32 Stunden nach der Insemination durch Spülung der Eileiter gewonnenen Eizellen konnten 197 nach Einbetten in Paraffin in Serienschnitten untersucht werden. Keine dieser Eizellen zeigte morphologische Besonderheiten.

4. Bei der autoradiographischen Auswertung wurden insgesamt bei 165 Ova Markierungen gefunden. 89 befanden sich im Ein-, 15 im Zwei-, 53 im Vier- und 8 im Achtzellstadium. Im Einzellstadium war 32 mal Kern und Zytoplasma, und 57 mal nur das Zytoplasma markiert. Von den 108 Zygoten der übrigen Entwicklungsstadien wiesen 76 Silberkörner über Kern und Zytoplasma auf, während das Zytoplasma nie allein markiert war.

5. Der Unterschied in der Zahl der Silberkörner im histologischen Schnitt pro Flächeneinheit von $100\mu^2$ war im Ein-, Zwei- und Vierzellstadium zwischen Kern mit $2,75 \pm 0,72$, $3,44 \pm 0,43$ und $3,82 \pm 1,47$ ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) und Zytoplasma mit $0,24 \pm 0,06$, $0,26 \pm 0,04$ und $0,33 \pm 0,07$ signifikant ($P \leq 0,01$). Die Gesamtzahl der Markierungen aller Kerne der Zygoten nahm vom Einzellstadium mit $8,13 \pm 1,19$ zum Zwei-, Vier- und Achtzellstadium mit $33,67 \pm 5,02$,

$37,53 \pm 2,18$ und $36,75 \pm 3,29$ signifikant zu ($P \leq 0,01$)

6. Die gefundenen Silberkörner über dem Zytoplasma werden, neben dem Nulleffekt, auf die Aufnahme von Stoffwechselprodukten aus Samenzellen im Eileiter zurückgeführt. Das erhebliche Ansteigen der Gesamtintensität der Markierung über der Kernsubstanz vom Ein- zum Mehrzellstadium kann hypothetisch als Einbau von DNS-Bausteinen aus Spermien, die nicht an der Amphimixis beteiligt waren, interpretiert werden.

7. Die Versuche ergaben, daß entweder eine spezifische Kennzeichnung der Zygoten bis zum 8-Zellstadium durch Befruchtung mit H^3-Thymidin markierten Spermien möglich ist, oder daß die Kernsubstanz nicht zur Befruchtung gelangender Spermien in den ersten Teilungsvorgängen der Zygote eine Rolle spielt.

SUMMARY

1) Rabbit ova which had been fertilized by spermatozoa labeled with tritiated thymidine were examined autoradiographically.

2) 1,0 mCi H^3-thymidine per kg body weight was administered to male rabbits of 2 kg body weight four times with intervals of 12 hours. Daily ejaculated spermatozoa were examined from day 38-56 post injection and were found to be highly labeled from day 45 to day 56.

During the latter interval, 37,0 - 92,4% of 500 spermatozoa examined per ejaculate had 3 or more grains which were regarded being labeled sufficiently. 28,6% - 88,8% of highly labeled spermatozoa with 8 or more grains were observed within this time interval.

3) With labeled spermatozoa from two bucks on days 45 - 47 p.i. 19 female rabbits were inseminated after superovulation. The rabbits were sacrificed 28 to 32 hours after insemination. Out of 442 ova collected, 197 were detected in serial sections. There were no morphological abnormalities.

4) After autoradiography 165 of the 197 ova were determined to be labeled. Of these ova 89 were found in the one-cell-stage, 15 in the two-, 53 in the four- and 8 in the eight-cell-stage of cleavage. In the one-cell-stage on 32 occasions grains were found on both the nucleus and cytoplasm only. There were always grains on the nucleus and cytoplasm in the 76 remaining ova with cleavages, and the cytoplasm alone was never labeled.

5) The difference between the number of grains per square unit (100 μ^2) on the histological section was significantly higher in the nuclei of one-, two- and four-cell-stage with 2,75 $\pm$ 0,72, 3,44 $\pm$ 0,43 and 3,82 $\pm$ 1,47 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) than in the cytoplasm with 0,24 $\pm$ 0,06, 0,26 $\pm$ 0,04 and 0,33 $\pm$ 0,07 respectively ($P \leq 0,01$). The total number of grains of all nuclei increased significantly from the one-cell-stage of cleavage with 8,13 $\pm$ 1,19 to stage two, four and eight with 33,67 $\pm$ 5,02, 37,53 $\pm$ 2,18 and 36,75 $\pm$ 3,29 ($P \leq 0,01$).

6) Grains found on the cytoplasm were interpreted to be parts of spermatozoa degenerated and/or dissociated in the oviduct. The enormous increase in the

total number of grains on the nuclei from the one-cell-stage to the cleaved ova was hypthetically regarded to be from parts of spermatozoa DNA out of semen cells which did not participate in the fertilization.

7) It is concluded that a specific labeling of ova one-through eigth-cell-stage of cleavage by spermatozoa marked with tritiated thymidine is possible and that DNA of spermatozoa not involved in amphimixis participate in the first stages of cleavage of ova.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Adams, C.E. (1969):
Die Fortbewegung der Spermien im weiblichen Genitaltrakt und ihre Beziehungen zur Fruchtbarkeit
Zuchthyg., 4, 49-56

Amann, R.P. (1962):
Reproductive physiology of the male bovine
Thesis Pennsylvania State Unversity

Amann, R.P., Koefoed-Johnson, H.H., Levi, H. (1965):
Excretion pattern of labelled spermatozoa and the timing of spermatozoa formation and epididymal transit in rabbits, injected with thymidine-H^3
J. Reprod. Fertil 10, 169-183

Asdell, S.A. and Salisbury G.W. (1941)
The rate at which spermatogenesis occurs in the rabbit
Anat. Record. 80, 145-153

Austin, C.R. (1961):
The mammalian egg: Manipulation of eggs
Blackwell Scientific Publications, Oxford 103-107

Bedford, J.M. (1970):
Sperm capacitation and fertilization in mammals
Biol. Reprod. Supl. 2, 128-158

Bélanger, L.F., Leblond, C.P. (1946):
A method for locating radioactive elements in tissues by covering histological sections with a photographic emulsion
Endocrinol. 39, 8

Bélanger, L.F. (1950):
Détection histologique des éléments radioactifs à l'aide d'émulsions photographiques fluides sur lames
Acta Unio Intern. contra Cancrum 7, 810-813

Bierwag, K. und Döring, G.K. (1958):
Über die Wirkung eines Hyaluronidase-Inhibitors auf die Fruchtbarkeit der weißen Ratte
Arch. f. Gynäkol. 191, 161-168

Boyd, G.A. (1955):
Autoradiography in Biology and Medicine
Acad. Press, New York

Broda, E. (1958):
Radioaktive Isotope in der Biochemie
Franz Deudike, Wien, 3, 73-76

Bouchard, C.H., Curie, P. und Balthazard (1904):
Action physiologique de l'émanation du radium
Compt. rend. 138, 1384-1387, zitiert nach Boyd, 1955

Clermont, Y. und Leblond, C.P. (1959):
Differentiation and renewal of spermatogonia in the monkey Macacus rhesus
Amer. J. Anat. 104, 237

Clermont, Y. und Leblond, C.P. (1955):
Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the "periodic acid Schiff technic"
Amer. J. Anat. 96, 229

Clermont, Y. (1963):
The cycle of the seminiferous epithelium in man
Amer. J. Anat. 112, 35

Clermont, Y., Leblond, C.P. et Messier, B. (1959):
Durée du cycle de l'éithelium seminal du rat
Arch. Anat. microsc. et morph. 48, 37

Colwin, L.H. und Colwin, A.C. und Philpott, H. (1957):
Electron microscope studies of early stages of sperm penetration in Hydroides hexagomus and Saccoglossus kowalsvskii
J. biophys. biochem. cytol. 3, 489

Dan, C.I. (1956):
The acrosome reaction
Int. Rev. Cytol. 5, 365

v. Deinling O., Witsch, K. und Rossner, R. (1968):
Methoden zur nachträglichen PAS- und Feulgenfärbung bei entwickelten autoradiographischen Paraffinschnitten
Histochemie 14, 242

Dennis, E.S. und Wake, R.G. (1966):
Autoradiography of the Bacillus subtilis Chromosome
J. molec. Biol. 15, 435

Diab, I.M., Roth, L.J. (1970):
Autoradiographic differentiation of free, bound, pure and impure thymidine-H^3
Stain Technology 45, 285-291

Dickmann, Z. (1961):
The role of the Cumulus oophorus and tubal factors in the process of fertilization of the rabbit egg
Proc. IV. Intern. Congr. on Anim. Reprod.,
Den Haag, 5.-9. Juni 1961, Vol,IX 731-735

Dziuk, P. (1965):
Double mating of rabbits to determine capacitation time
J. Reprod. Fertil. 10, 389-395

v. Ebner, V. (1878):
Zur Spermatogenese bei den Säugethieren
Arch. mik. Anat. 31, 236-292

Edwards, R.G. und Sirlin, I.L. (1958):
Isotopenstudien über Befruchtung bei Säugern
Endeavour 17, 42

Fitzgerald, P.J., Simmel, E., Weinstein, J. und Martin, C. (1953):
Radioautography, Theory, Technic and Application
Lab. Invest. 2, 181

Fischer, H.A. und Werner (1971):
Autoradiographie
De Gruyter und Co, Berlin

Foote, R.H. (1959):
The use of radioactive isotopes to study spermatogenesis and transport of spermatozoa in mammals
Symposia Genetica et Biologica Italia IX

Franzén, A. (1958):
On sperm morphology and acrosome filament formation in some Annelida, Echiuroidea and Tunicata
Zool. Bidrag, Uppsala 33, I

Getoff, N. (1961):
Kurzes radiochemisches Praktikum, Wien
zitiert nach: Römpp, H. 1963
Isotope, Die Kosmos-Bibliothek 238

Groven, Ch., Govaerts, J. und Guében, G. (1938):
Photographic action of artificial radio-elements
Nature 141, 916-917

Hanle, W. und Mitarbeiter (1964):
Isotopentechnik
Thiemig, München

Heller, C.G. und Clermont, Y. (1963):
Spermatogenesis of man: an estimate of its duration
Science 140, 184

Hilscher, B. und W., Maurer, W. (1966):
Autoradiographische Bestimmungen der Generationszeiten und Teilphasen der verschiedenen Spermatogonien-Generationen der Ratte
Naturwissenschaften 53, 115-116

Hilscher, W. und Hilscher, B. (1969):
Autoradiographische Untersuchungen über Kinetik der Spermatogenese der Wistarratte unter besonderer Berücksichtigung der Spermatocytogenese
Z. Zellforsch. 96, 625-640

Hilscher, B. und W., Maurer, W. (1969):
Autoradiographische Untersuchungen zum Modus der Proliferation und Generation des Samenepithels der Wistarratte
Z. Zellforsch. 94, 593-604

Höfling, O. (1959):
Lehrbuch der Physik
Dümmler, Hamburg

Huckins, C. (1965):
Duration of spermatogenesis in pre- and postpuberal Wistarrats
Anat. Rec. 151

Hunt, W.L. und Foote, R.H. (1967):
Efficiency of liquid scintilation counting and autoradiography for detecting tritium in spermatozoa
Rad. Res. 31, 63-73

Hunter, R.H.F. and Dziuk, P.J. (1968):
Sperm penetration of pig eggs in relation on the timing of ovulation and insemination
J. Reprod. 15, 199-208

Hupp, E.W., Austin, I.W. and Murphree, R.L. (1961):
Radioisotope labelling of sperm in bulls and rabbits
J. Anim. Sci. 20, 973

Joftes, D.L. and Warren, S. (1955):
Simplified liquid emulsion radioautography
J. Biol. Photographic A. 23, 145

Kennelly, J.J. and Foote, R.H. (1966):
Oocytogenesis in Rabbits
Am. J. Anat. 118, 573-590

Koefoed-Johnson, H.H. (1959):
The influence of frequency of semen collection on the formation time and transport time of spermatozoa in bulls
Annual Report of The Royal Veterinary and Agricultural College Sterility Research Institute, Copenhagen

Koefoed-Johnson, H.H. and Foote, R.H. (1959):
The use of Adenine-8-C^{14} for studying spermatogenesis in the rabbit
Animal Sci. 18, 1553

Koller, R. (1966):
Das Schicksal der Spermien im weiblichen Genitaltrakt der Haustiere
Berichte 16. Intern. Fachtagung für künstliche Besamung der Haustiere in Wels vom 29. bis 31.7.1966

Kopečný, V., Koefoed-Johnson, H.H. und Fulka, I. (1962):
Application of isotope labelled spermatozoa in studies on fertilization of mouse and rabbit ova.
Annual Report of The Royal Venerinary and Agricultural College Sterility Research Institute, Copenhagen

Kotzareff, A. (1922):
Photographies des organes par l'émanation du radium ou radiographie (curographie)
J. radiol. et électrol. 6, 131-133
zitiert nach Boyd 1955

Kramer, M.F. (1960):
Spermatogenesis bij de stier
Diss. Utrecht

Lacassagne, A. und Lattes, J. (1924):
Mise en évidence, par l'autoradiographie des organes, des localizations histologiques du Polonium injecté dans l'organisme
Bull. histol. appl. physiol. et pathol. et tech. microscop. 1, N. 6, 1-6

Lauda, H. (1954):
Photographische Methoden in der Radiochemie, Handbuch der mikroskopischen Methoden
Springer, Wien

Leblond, C.P. (1943):
Locating iodine in tissues autoradiographically, especially after fixation by freezing and drying
Stain Technol. 18, 159-164

Leblond, C.P. and Clermont, Y. (1952):
Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the "periodic acid-fuchsin sulfours acid" technique
Amer. J. Anat. 90, 167

London, E.S. (1904):
Etudes sur la vapeur physiologique et pathologique de l'émanation du radium
Arch. élect. med. 12, 363-372

Mann, T. (1964):
The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract
Methuen and Co Ltd, London
John Wiley and Sons Inc, New York

Maurer, R.R. (1969):

Aging and Embryonic Mortality in Dutch-Belted Rabbits

Thesis, Cornell University

Metz, C.B. and Monroy, A. (1969):

Fertilization II

Academic Press, New York, S. 370-380

Mudra, A. (1958):

Statistische Methoden für Landwirtschaftliche Versuche

Paul Parey, Berlin und Hamburg

Nebel, B.R., Murphry and Linder, H.J. (1960):

Autoradiographic study with tritiated thymidine on mouse testis after 320r and after 1000r of acute localized X-irradiation

Radiation Res. 13, 126

Oakberg, E.F. (1956):

Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of seminiferous epithelium

Amer. J. Anat. 99, 507

Onuma, H., Maurer, R.R. und Foote, R.H. (1968):

In vitro culture of rabbit ova from early cleavage stages to the blastocyst stage

J. Reprod. Fert. 16, 491

Orgebin-Crist, M.C. (1965):

Passage of spermatozoa labelled with thymidine-H^3 through the ductus epididymidis of the rabbit

J. Reprod. Fertil. 10, 241-251

Ortavant, R. (1954):

Contribution à l'étude de la durée du processus spermatogenetique du bélier à l'aide de P-32

C.R. Soc. Biol. (Paris) 148, 804-806

Ortavant, R. (1956):

Autoradiographie des cellules gérminales du testicules de bélier. Durée des phénomènes spermatogenetiques

Arch. Anat micr. Morph. exp. 45, 1.

Ortavant, R. (1959):

Spermatogenesis and morphology of the spermatozoon

In: Cole and Cups: Reproduction in domestic animals

II. Academic Press, New York

Ortavant, R., Orgebin, M.C., Singh, G. (1961):

Étude comparative de la durée des phénomènes spermatogenetiques chez les animaux domestiques

Proc. of the Conf. on the use of radio-isotopes in anim. biol. and the medical sciences, Mexico City 1961

Pelc, S.R. (1956):

The stripping-film technique of autoradiography

Int. J. appl. Radiat. 1, 172

Rogers, A.W. (1967):

Techniques in autoradiography

American Elsevier Publishing Co., New York

Roosen-Runge, E.C. (1951):

Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat

Amer. J. Anat. 88, 163-176

Schaetz, F. (1963):

Die künstliche Besamung bei den Haustieren

G. Fischer, Jena

Schmeiser, K. (1957):

Radioaktive Isotope

Springer, Berlin

Schweitzer, G. und Whitney, I.B. (1949):
Radioactive tracer techniques
Nostrand, New York

Schwiegk, H. (1961):
Künstliche Autoradiographie in Physiologie, Diagnostik und Therapie
Springer 76, Berlin

Sirlin, J.L. und Edwards, R.G. (1958):
The labelling of mammalian spermatozoa with radioactive tracers
J. Exper. Zool. 137, 363-388

Steinbach, J. and Foote, R.H. (1964):
Post thaw survival of bovine spermatozoa frozen by different methods in buffered-yolk and skinmilk extenders
J. Dairy Sci. 47, 909

Stranzinger, G.F., Maurer, R.R., Paufler, S.K. (1971):
Fertility of frozen rabbit semen
J. Reprod. Fert. 24, 111-113

Swierstra, E.E. and Foote, R.H. (1965):
Duration of spermatogenesis and spermatozoon transport in the rabbit based on cytological changes, DNA synthesis and labelled with tritiated thymidine
Exp. Amer. J. Anat. 116, 401-411

Swierstra, E.E. (1968) a:
A comparison of spermatozoa production and spermatozoa output of Yorkshire and Lacombe boars
J. Reprod. Fertil. 17, 459

Swierstra, E.E. (1968) b:
Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar, duration of spermatozoon transit through the epididymis
Anat. Rec. 161

Takeda, A., Lutwak-Mann, C. und Mann, T. (1968):
Labelling of semen with radioactive phosphate
J. Reprod. Fertil. 16, 141-143

Thurston, I.M. und Joftes, D.L. (1963):
Stains compatible with dipping radioautography
Stain Technol. 38, 231

Tiba, T. (1965):
Methodologisch orientierte quantitative Untersuchung der Spermatogenese beim Bullen
Jap. J. Vet. Res. 13

VanDemark, N.L. und Moeller, A.N. (1951):
Speed of spermatozoon transport in reproductive tract of estrous cow
Am. J.Physiol. 165, 674

Wang, C.H. and Willis, D.L. (1965):
Radiotracer methodology in biological science
Prentice-Hall, Inc., New York

Wirton, H. (1965):
Sperm capacitation by uterine fluid or beta-amylase in vitro
Science 150, 618-619

Yagoda, H. (1949):
Radioactive measurement with nuclear emulsions
Wiley, New York

Yamane, T. (1932):
zitiert n. Koller, R. (1966)

Yassen, A.M. and Foote. R.H. (1963):
Autoradiography of rabbit sperm
J. Animal Sci. 22, 867

Außerdem wurden verwendet:

Kodak Data Booklet SC-10

Römpp, F. (1963):
Isotope
Die Kosmos Bibliothek, 238, 27-30

Herrn Prof. Dr. W. Leidl danke ich für die Überlassung des Themas und für seine freundliche Unterstützung bei der Ausführung dieser Arbeit.
Für die Hilfe bei der Anfertigung der Autoradiogramme möchte ich mich bei Prof. Dr. W. Hilscher bedanken.
Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn Prof. Linsen und Herrn Dr. Scharrer, in deren Isotopenlabors ich die Versuchstiere unterbringen durfte.

LEBENSLAUF

Am 1. Juli 1942 wurde ich als Sohn des Architekten Jakob Prinzen und seiner Gattin Grete geb. Kornacher in Krefeld geboren.

Nach 4 Jahren Volksschule besuchte ich das neusprachliche Gymnasium am Molkteplatz in Krefeld bis zur Obersekunda. Anschließend wechselte ich auf das private Ernst-Kalkuhl-Gymnasium in Oberkassel/Bonn über, wo ich im Herbst 1965 mein Abitur ablegte.

Seit dem Wintersemester 1965/66 studierte ich an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München. Mein Studium schloß ich im Herbst 1970 an der gleichen Fakultät mit dem Staatsexamen ab.